

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Anatomi Anabilim Dalı

G α GENİNİN DİYABETİK KARDİYAK HİPERTROFİ
VE
VEGFR2 AKTİVASYONU ÜZERİNE OLAN ETKİSİ

Yasemin BEHRAM KANDEMİR

Doktora Tezi

Antalya, 2016

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Anatomi Anabilim Dalı**

**G α GENİNİN DİYABETİK KARDİYAK HİPERTROFİ
VE
VEGFR2 AKTİVASYONU ÜZERİNE OLAN ETKİSİ**

**Yasemin BEHRAM KANDEMİR
Doktora Tezi**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Fatoş Belgin YILDIRIM**

Antalya, 2016

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Enstitü Kurulu ve Akdeniz Üniversitesi Senato Kararı

Sağlık Bilimleri Enstitüsünün 22.06.2000 tarih ve 02/09 sayılı Enstitü Kurulu kararı ve 23.05.2003 tarih ve 04/44 sayılı Akdeniz Üniversitesi Senato kararı gereğince “Sağlık Bilimleri Enstitülerinde lisansüstü eğitim gören doktora öğrencilerinin tez savunma sınavına girebilmeleri için, doktora bilim alanında en az bir yurtdışı yayın yapması gerektiği” ilkesi gereğince yapılan yayın aşağıda belirtilmiştir (Orijinali ekte sunulmuştur).

Kaya Y, Ozsoy U, Turhan M, Angelov DN, Sarikcioglu L. Hypoglossal-facial nerve reconstruction using a Y-tube-conduit reduces aberrant synkinetic movements of the orbicularis oculi and vibrissal muscles in rats. Biomed Res Int. 2014;2014:543020. doi: 10.1155/2014/543020. Epub 2014 Dec 9.

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Bu çalışma jürimiz tarafından Anatomi Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir. 29/04/2016

Tez danışmanı : Prof. Dr. Fatoş Belgin YILDIRIM
Akdeniz Üniversitesi, Tıp Fakültesi
Anatomi Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Levent SARIKCIOĞLU
Akdeniz Üniversitesi, Tıp Fakültesi
Anatomi Anabilim Dalı

Üye : Doç.Dr. Ünal GÜNTEKİN
Akdeniz Üniversitesi, Tıp Fakültesi
Kardiyoloji Anabilim Dalı

Üye : Doç. Dr. Mustafa EMMİLER
Antalya Eğitim Araştırma Hastanesi
Kalp Damar Cerrahisi Kliniği

Üye : Prof. Dr. Nihal APAYDIN
Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi
Anatomi Anabilim Dalı

ONAY:

Bu tez Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../2016 tarih ve/..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Narin DERİN
Enstitü Müdürü

ÖZET

G alfa11 geninden yoksun farelerde kalp hipertrofinin geliştiği bilinmesine karşın vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) ve bunun reseptörlerinden biri olan VEGFR2'nin kalp hipertrofinde ve koroner anjiogenezindeki rolü açıklığa kavuşmamıştır. G alfa11 geninin, VEGFR2'nin fosforilasyonundaki rolünü çalışmak amacıyla G alfa11 geninden yoksun (Galfa11 knockout) ve normal (wildtype) farelerde tip 1 diyabet yaratılmıştır. VEGFR2'nin total ve fosforile formlarının ekspresyonu kantitatif immunohistokimya yöntemi ile koroner damar ve miyokardiyal kas liflerinde araştırılmıştır.

Diyabetin etkisiyle VEGFR2'nin total ve fosforile formlarının ekspresyonunda, istatistiksel olarak anlamlı bir azalma oluştuğu tespit edildi. Aynı etki hem kas liflerinde hem de koroner damarlarda gözlemlendi. G alfa11 geninden yoksun nondiyabetik ve diyabetik deneklerde p-VEGFR2 boyanma yoğunluğu normal tip nonbiyabetik ve diyabetik deneklere oranla daha az olduğu tespit edildi. Bu bulgular G alfa11 geninin VEGFR2'nin fosforilasyonunda gerekli olduğunu gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: VEGF, VEGFR2, VEGFR2 fosforilasyonu, diabetes mellitus

ABSTRACT

It is known that G alfa11 knockout mice develop ventricular heart hypertrophy. But the role of vascular endothelial growth factor (VEGF) and activation of its receptor VEGFR2 in heart hypertrophy and in coronary angiogenesis remains to be clarified. To study the role of G alfa11 regulating phosphorylation of VEGFR2 in coronary blood vessels and in myocardial fibers of the diabetic animals, we induced diabetes mellitus (type 1) in wildtype and G alfa11 knockout mice. Expression of total VEGFR2 and localization of activated form of VEGFR2 were examined in coronary blood vessels and myocardial fibers by using quantitative immunohistochemistry.

We detected a statistically significant decrease in expression at total and phosphorylated forms of VEGFR2. Same effect were found in myocardial fibers and coronary vessels. The staining intensities for p-VEGFR2 in G-protein G alfa11 knockout Nondiabetic and G-protein G alfa11 knockout Diabetic animals were weakly found than those of Wild-Type Nondiabetic and Wild-Type Diabetic animals. No difference was found in staining intensities of p-VEGFR2 in myocardial fibers between Wild-Type Nondiabetic and Wild-Type Diabetic animals. This finding indicates that G alfa11 is essential for the phosphorylation of VEGFR2 in myocardial fibers.

Keywords: VEGF, VEGFR2, phosphorylation of VEGFR2, diabetes mellitus

TEŞEKKÜR

Tez savunma sınavımda jüri üyeliği yapan sayın hocalarıma, ve özellikle akademik hayatım boyunca bana verdiği destek ve katkılarından dolayı danışman hocam Prof.Dr. Fatoş Belgin Yıldırım'a

Doktora çalışmam boyunca yol göstericiliği ve tezimin gerçekleşmesi için verdiği her türlü emekten dolayı, sayın hocam Prof. Dr. Levent Sarıkcıoğlu'na,

Çalışmam süresince ihtiyaç duyduğum her an desteğini esirgemeyen Köln Üniversitesi Anatomi Anabilim Dalı Öğretim Üyesi, sayın Yüksel Korkmaz hocama,

Yüksek lisans ve doktora eğitimim boyunca, bana verdikleri emeklerden dolayı Anatomi Anabilimdalı tüm öğretim üyelerine,

Bu zorlu yolda gösterdiği anlayış, özveri ve destek için, sevgili eşim Şurzan Kandemir'e, sevgisiyle ve gözlerindeki ışıkla hep yanımda olan, bana motivasyon sağlayan biricik kızım Esmâ Yağmur Kaya'ya,

Tüm eğitimim boyunca bana sağladıkları destek ve tüm imkânlar için sevgili ailemin tüm fertlerine, sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yasemin Behram Kandemir

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	xiii
GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	3
2. 1. Diabetes Mellitus	3
2. 2. Diabetes Mellitus'un Tarihçesi	3
2. 3. Diabetes Mellitus'un Epidemiyolojisi	4
2. 4. Diabetes Mellitus'un Fizyopatolojisi	5
2. 5. Diabetes Mellitus'un Tanı Kriterleri	5
2. 6. Diabetes Mellitus'un Sınıflandırılması	5
2. 7. Deneysel Diyabetik Kalpte Görülen Mekanik Değişiklikler	5
2. 8. Diyabetin Kardiyovasküler Hastalıklar Üzerindeki Etkisi	6
2. 9. Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF)	7
2. 10. VEGF Reseptörlerinin Aktivasyonu	9
2. 11. VEGF Gen Ekspresyonunun Düzenlenmesi	10
2. 12. G Proteinlerinin Yapısı	11
2.13. G Proteinin α -Alt Birimlerinin Yapısı	13
2.14. G Proteinlerinin α -Alt birimlerinin Çeşitleri	14
MATERYAL VE METOT	16
3. 1. Denekler	16
3. 2. Deney Grupları	16
3. 3. Diyabetin Oluşturulması Ve Diyabet Oluşumunun Tespiti	16
3.4. Kardiyak Hipertrofinin Tespiti	17
3. 5. Deneklerin Sakrifikasyonu Ve Doku Eldesi	17
3. 6. İmmünohistokimyasal Boyama	17
3. 7. İmmünohistokimyasal Boyanmaların Dansitometrik Analizi	19
3. 8. Western Blot Analizi	19
3. 9. Veri analizi	20

BULGULAR

4. 1.	Kan Glukoz Seviyeleri	21
4.2.	Diyabetin ve Gα11 Geninin Kalp Hipertrofisine Olan Etkisi	21
4.3.	Kantitatif İmmünohistokimyasal Analiz	22
4. 4.	Koroner Damarlarda t-VEGFR2'nin Ekspresyonu	22
4. 5.	Koroner Damarlarda p-VEGFR2'nin Ekspresyonu	24
4. 6.	Kalp Kası Liflerinde t-VEGFR2'nin Ekspresyonu	26
4. 7.	Kalp Kası Liflerinde p-VEGFR2'nin Ekspresyonu	28
4. 8.	Western Blot Analizi Bulguları	31

TARTIŞMA	33
-----------------	-----------

SONUÇLAR	37
-----------------	-----------

KAYNAKLAR	39
------------------	-----------

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

VEGF	: Vascular endothelial growth factor (Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü)
Gα/9	: G alfa 9
Gα/11	: G alfa 11
DM	: Diabetes mellitus
NDDG	: National Diabetes Data Group (Ulusal Diyabet Veri Grubu)
WHO	: World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)
ADA	: American Diabetes Association (Amerikan Diyabet Birliği)
IDF	: International Diabetes Federation (Uluslararası Diyabet Federasyonu)
EASD	: European Association for the Study of Diabetes (Avrupa Birliği Diyabet Çalışması)
HbA1c	: Hemoglobin A1c
β-AR	: Beta adrenerjik
STZ	: Streptozotosin
KDR	: Kinase Domain Region (Kinaz domain alanı)
VEGF-A	: Vascular endothelial growth factor A (Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü A)
VPF	: Vascular permability factor(Vasküler geçirgenlik faktörü)
PGF	: Placenta growth factor (Plasenta büyüme faktörü)
VEGF-B	: Vascular endothelial growth factor A (Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü B)
VEGF-C	: Vascular endothelial growth factor C (Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü C)
VEGF-D	: Vascular endothelial growth factor D (Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü D)
VEGF-E	: Vascular endothelial growth factor E (Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü E)
	: Tip 2 Melatonin reseptörü
VEGFR-1	: Vascular endothelial growth factor reseptor 1 (Vasküler Endotelial Büyüme Faktör reseptörü 1)
Flt-1	: Fms- like tyrosin kinase 1 (Vasküler Endotelial Büyüme Faktör reseptörü 1)
VEGFR-2	: Vascular endothelial growth factor reseptor 2 (Vasküler Endotelial Büyüme Faktör reseptörü 2)
KDR	: Kinase insertdomain-containing receptör (Vasküler Endotelial Büyüme Faktör reseptörü 2)
VEGFR-3	: Vascular endothelial growth factor reseptor 3 (Vasküler Endotelial Büyüme Faktör reseptörü 3)
MAP	: Mitogen Activeted Protein (Mitojen aktive eden protein)
DAG	: Diaçilgliserol
IP3	: İnositol trifosfat
bp	: Base pair (Baz çifti)

kb	: Kilo baz
HRE	: Hypoxia-response element (Hipoksi yanıt elementi)
HIF	: Hipoksi ile indüklenebilen faktör
Pi	: Fosfor
Val	: Valin
Gly	: Glisin
TGF	: Transforming growth factor
IL-1	: İnterlökin 1
PGE2	: Prostaglandin E2
TSH	: Thyroid- stimulating hormone (Tiroid stimüle edici hormon)
ACTH	: Adrenocorticotropic hormone
GDP	: Guanosine diphosphate
GTP	: Guanosine triphosphate
cGMP	: Cyclic guanosine monophosphate (Siklik guanizin monofosfat)
cAMP	: Cyclic adozin monofosfat (Siklik adozin monofosfat)
PIP	: Phosphatidyl inositol bisphosphate (Fosfotidil inositol bifosfat)
WT	: Wild type (Normal Tip)
KO	: Knockout (Galfa 11 geninden yoksun)
PVDF	: Polivinilidin Florür ((C ₂ H ₂ F ₂) _n)
TBS	: Tris-buffered salin
BSA	: Bovin serum albümin
NGS	: Normal Goat Serum
DAB	: Diaminobenzidine tetrahydrochloride
T-PER	: Tissue Protein Extraction Reagent
WT-NDM	: Normal-tip + Nondiyabetik
WT-DM	: Normal-tip + Diyabetik
KO-NDM	: Gα11 geninden yoksun + Nondiyabetik
WT-DM	: Gα11 geninden yoksun + Diyabetik
TBS	: Tris Buffer Solüsyonu
MHC	: Majör Histokompatibilite Kompleksi
PPARα	: Proliferatör aktive edilmiş reseptör-α
PLC	: Fosfolipaz C
PIP2	: Fosfotidilinozitol 4,5-bisfosfat
IP3	: İnozitol 1,4,5-trifosfat
DAG	: Diaçilgliserol

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil		Sayfa
2.1.	VEGF izoformları ve reseptörleri.	8
2.2.	G proteini ve alt üniteleri.	12
2.3.	Gα alt üniteleri ve etkileri.	15
4.1.	Koroner damarlarda VEGFR2'nin total formunun lokalizasyonu ve boyanma yoğunluğunun dansitometrik analizi.	24
4.2.	Koroner damarlarda VEGFR2'nin fosforile formunun lokalizasyonu ve boyanma yoğunluğunun dansitometrik analizi.	26
4.3.	Myokardial kas liflerinde VEGFR2'nin total formunun lokalizasyonu ve boyanma yoğunluğunun dansitometrik analizi.	28
4.4.	Myokardial kas liflerinde VEGFR2'nin fosforile formunun lokalizasyonu ve boyanma yoğunluğunun dansitometrik analizi.	30
4.5.	Myokardial kas liflerinde VEGFR2'nin total ve fosforile formlarının western blot bantları izlenmektedir.	32

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo		Sayfa
2.1	Memeli G proteini α -alt birimleri.	14
3.1	Deney grupları.	16
4.1	Diyabet oluşturulan deney gruplarında kan glukoz düzeyleri (mg/dL).	21
4.2.	Elektrokardiyografi sonuçları.	22
4.3	Kroner damarlarda t-VEGFR2'nin ekspresyonu (Dansitometrik ünite).	23
4.4	Kroner damarlarda p-VEGFR2'nin ekspresyonu (Dansitometrik ünite).	25
4.5.	Myokardial kas liflerinde t-VEGFR2'nin ekspresyonu (Dansitometrik ünite).	27
4.6.	Myokardial kas liflerinde p-VEGFR2'nin ekspresyonu (Dansitometrik ünite).	29

GİRİŞ VE AMAÇ

Diabetes mellitus'un kardiyovasküler komplikasyon riskini 2-4 kat arttırdığı ve diyabetle ilişki ölümlerin dörtte üçünü oluşturduğu rapor edilmiştir [1, 2]. İnsulin bağımlı (tip 1) ve insulin bağımlı olmayan (tip 2) diabetes mellitus, azalmış ventriküler diastolik gevşeme, azalmış dolma zamanı, ventriküler hipertrofi ile karakterize olan kardiyomiyopati'ye sebep olur [3-5]. Diyabetik kardiyomiyopati, iskemik kardiyomiyopatiden farklıdır, bunun nedeni diyabete bağlı değişen hücresel ortam değişikliğidir. Hücre ortamının değişmesiyle reseptör bağımlı sinyal yollarında değişmektedir, özellikle G protein aracılı aktivasyon gösteren proteinlerin kardiyomiyopatideki ekspresyonları değişiklik gösterir [6, 7].

G proteinleri, (Guanin nükleotid-bağlayıcı proteinler) hücrenin dışından gelen sinyalleri hücre içine ileten ve hücre içinde değişiklikler oluşturan bir protein ailesidir. Birçok hormonlar, nörotransmitterler ve diğer sinyal iletim molekülleri, sinyallerini hücre içine bu yolla iletirler [8]. G proteinler, heterodimerik bir yapı gösterirler, α ve β alt ünitelerinden oluşurlar. $G\alpha/9$ ve $G\alpha/11$ alt üniteleri memelilerde sadece kalpte eksprese olurlar. $G\alpha/11$ proteini ve mediatörleri patolojik hipertrofi de salınırken, normal fizyolojik durumda görülmez [9, 10].

Anjiogenez endotelial hücre proliferasyonu, migrasyon, morfolojik diferansiyasyon gibi çeşitli hücresel süreçler tarafından regüle edilir ve intraselüler sinyal yolları ile yakından ilişkilidir [11]. VEGF anjiogenezini indükler ve endotelial proliferasyonu, permeabiliteyi modüle eder ve arter, ven, lenf damarları için endotel hücrelerine spesifik bir mitojendir [12, 13]. VEGF, endotel hücreleri için sadece direkt bir mitojen olmayıp, aynı zamanda *in vivo* düzeyde kapiller oluşumunu stimüle eden potent anjiogenezik bir rol sahiptir [14].

VEGF'in, kardiyovasküler sistem üzerindeki etkilerini hangi mekanizmalar üzerinden gerçekleştirdiği bu anlamda önem kazanmaktadır [15].

VEGF'in bir multifonksiyonel sitokindir ve *in vitro* olarak endotel hücrelerinde ve *in vivo* olarak erişkin damarlarında çeşitli biyolojik etkilere sahiptir.

G proteininin kardiyak hipertrofide etkin olduğu yapılan çalışmalarda bildirilmiştir [8], ancak VEGF ve onun reseptörlerinden biri olan VEGFR2'nin, kardiyak hipertrofideki rolü henüz tam açıklanmamıştır. Çalışmamızda amacımız; G α /11 geninin diyabetik kardiyak hipertrofiye ve VEGFR2 mekanizması üzerine olan etkisini tespit etmektir. Bu amaçla hem kalp kasında hem de koroner damarlarda, VEGFR2' nin ekspresyonuna bakılırken aynı zamanda onun aktif formu olan fosforile VEGFR2' ye de bakılması planlanmıştır, böylece kalp kasında diyabetin ve G α /11geninin etkisiyle VEGFR2'nin fosforilasyonunda ne gibi bir değişiklik olduğu araştırılmıştır.

GENEL BİLGİLER

2. 1. **Diabetes Mellitus**

Tüm dünyada en sık rastlanan endokrin hastalık olarak tanımlanan diabetes mellitus (DM), hiperglisemi ile karakterize olan ve karbonhidrat, protein ve lipid metabolizmalarının bozukluğu ile seyreden, kronik ve progressif bir hastalıktır.

2. 2. **Diabetes Mellitus'un Tarihçesi**

Şekerli idrar yapma anlamına gelen Yunanca olduğu bilinen bu terimin ilk kez milattan sonra ikinci yüzyılda kullanıldığı sanılmaktadır. Ancak milattan önce 1500'lere uzanan DM ile ilişkili ilk tanımlamalara, Mısır'daki Eber yazıtlarında rastlanmıştır. O günden bu yana Yunanistan'dan Çin'e birçok hekim, hastalığın klinik özelliklerini tanımlamıştır. Romalı hekimler diyabeti, mellitus ve insipitus diye iki alt gruba ayıran kişilerdir [1].

2. 3. **Diabetes Mellitus'un Epidemiyolojisi**

DM dünyanın bazı yerlerinde az, bazı yerlerinde çok görülmektedir. Dünyada en büyük diyabet prevalansı Amerika'da yaşayan kıızılderililerde olup, görülme oranı % 55 civarlarındadır. Grönland ve Alaska eskimolarında ise DM prevalansının çok düşük olduğu saptanmıştır. Gelecekte diyabet prevalansı daha da yükselecektir. Çoğunlukta Tip 2 DM'dir. DM'li hastaların artması, gelecekte hasta sağlığını tehdit eden en önemli konulardan biridir. 2000 yılında 24.748 kişi üzerinde yapılan Türkiye Diyabet Epidemiyoloji çalışmasında, Türkiyede Tip 2 DM prevalansı %7.2 ve bozulmuş glukoz toleransı prevalansı ise % 6.7 olarak saptanmıştır. Günümüzde genel popülasyonda % 0.5-1 görülme oranı ile 3. sırada yer alan en önemli kronik hastalıklardan birisidir [2]. Prof. Dr. İlhan Satman; diyabet salgınının en önemli nedenini, toplumun yaşlanması, daha fazla yemek bulup daha az hareket edilmesi şeklinde ifade etmiştir. Özellikle ülkemizin yaş ortalaması, 97-98 yılında yapılan bir çalışmaya göre 41 civarındayken, şuanda 44-45 civarında olduğunu bildirmiştir [3].

2. 4. Diabetes Mellitus'un Fizyopatolojisi

Diabetes mellitus'un oluşumunda bilinen birincil sebepler; insülin yokluğu, yetersizliği veya insülin reseptörlerinin insüline direncidir. Bu olayların etiyolojik nedeni henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Diyabetin genetik ve çevresel etkiler sonucu geliştiği kabul görmektedir [4].

DM'de hiperglisemi iki bozukluğa bağlı olarak gelişir: 1- Karaciğer ve kas dokusunda oluşan insülin direnci, 2- Pankreasta insülin üretiminin gittikçe azalması. İnsülin direnci, halen bilinmeyen genetik defektlerle birlikte, çevresel etmenlerin etkisi ile gelişir. Çevresel etmenlerden en önemlileri obezite ve fiziksel aktivite eksikliğidir. DM'in doğal seyri sırasında, erken dönemde insülin direnci ve normal glukoz toleransı olan kişi, aşırı miktarda insülin salgılayarak uyum sağlamaya çalışır. Pankreastan, kas ve karaciğer dokusunun insülin direncini yenecek düzeyde insülin salgılamadığı zaman ise hiperglisemi gelişir. DM olan hastalarda, hem kas dokusu hem de karaciğer insüline dirençlidir. Normal bir öğünle alınan glukozun büyük çoğunluğu (%70'e yakın bölümü) kas dokusu tarafından kullanılır. Kas dokusunda insülin direnci, tokluk hiperglisemisi ve bozulmuş glukoz toleransına neden olur. Karaciğerin de insülin etkisine rezistansı olmasına karşın, glukoz toleransı bozulmuş kişilerde hiperinsülinemi karaciğerden açlık sırasında glukoz salgısına engellemeye yetecek düzeydedir. Böylece açlık plazma glukoz düzeyi normalin üzerine çıkmaz [5]. Hiperinsülinemi, beta hücrelerinin insülin direncini yenmek üzere verdikleri bir tampon yanıtıdır. İnsülinin karaciğer ve kas doku üzerine etki farkı böyle açıklanmaktadır: Karaciğerden glukoz salgılanmasını baskılamak için gerekli olan insülin miktarı, kas dokusuna glukoz emilimini sağlamak için gerekli olan insülin miktarının 1/3-1/4'ü kadardır. Zaman içinde karaciğerin insülin direnci yükselerek açlık kan şekerinde küçük bir artışa neden olur. Bu kişilerin açlık glukoz düzeyi bozularak 110-125 mg/dl düzeyine yükselir. Sonuçta pankreastan insülin salgısı azalıp karaciğerden uyku saatleri boyunca glukoz salgısı artarak açlık kan şekeri 125 mg/dl'nin üzerine çıkar [6].

2. 5. Diabetes Mellitus'un Tanı Kriterleri

Diyabet tanısı, klasik semptomlar ve komplikasyonlar var ise kolaylıkla konabilir. Bununla birlikte, erken tanı ve bazı laboratuvar yöntemlerinin doğru şekilde kullanılması, sonuçların tanı kriterlerine uygun olarak değerlendirilmesi önemlidir. Genellikle plazma glukoz kriterine bağlı olarak diyabet tanısı konulur, ya açlık plazma glukozuna bakılır ya da 75 g oral glukoz testinden sonra 2-saat plazma glukozu değerine bakılır. Amerikan Diyabet Birliği (ADA), Uluslararası Diyabet Federasyonu (IDF) ve Avrupa Birliği Diyabet Çalışması (EASD) tarafından 2009 yılında oluşturulan Uluslararası Uzman Komitesi, HbA1c değerini diyabet tanısında üçüncü bir seçenek olarak eklemiştir. Ancak HbA1c'nin tanı aşamasında kullanımının gerekli bir uygulama olmadığı vurgulanmaktadır [4].

2. 6. Diabetes Mellitus'un Sınıflandırılması

Diyabetin tip 1 ve tip 2 olmak üzere iki tipi vardır. Tip 1 diyabet, pankreasın beta hücrelerinin ürettiği insülinin ortadan kalkması ile ortaya çıkan ve sonuçta tam insülin yetersizliğinin oluşması ile karakterize bir hastalıktır. Bu tip diyabet “bağışıklık-aracılı” ya da “idyopatik” olarak ikiye ayrılabilir. Tip 1 diyabet hastalarının çoğunluğunu bağışıklık-aracılı tip oluşturur. Bu tipte pankreasın beta hücrelerinde oluşan kayıpların temel sorumlusu, T-hücre aracılı otoimmün yanıttır. Tip 2 diyabet, insülinin etkisine karşı, direnç gelişmesi ya da insülin duyarlılığının azalması ile insülin sentezi ve salgılanmasının göreceli azalması ya da bazen tamamen ortadan kalkması ile ortaya çıkan bir hastalıktır. Dokuların insüline karşı verdikleri yanıtın bozulmasının başlıca sorumlusu hücre membranında bulunan insülin reseptörüdür [7, 8]. Tip 1 ve tip 2 diyabetin makrovasküler komplikasyonları, koroner kalp hastalığı, serebrovasküler hastalık, periferik damar hastalığı olarak sınıflandırılırken; mikrovasküler komplikasyonları retinopati, nefropati ve nöropatidir.

2. 7. Deneysel Diyabetik Kalpte Görülen Mekanik Değişiklikler

β -adrenerjik reseptör (β -AR) agonistlerin inotropik ve kronotropik yanıtlarında azalmanın olması, streptozotosinle oluşturulan diyabetik (Tip 1) hayvan modellerinde tipiktir [9-11]. Bradikardi, streptozotosin (STZ) injeksiyonundan hemen sonra diyabetik sıçanlarda en sıklıkla ortaya çıkan

bulgudur [12]. Vagal aktivite artışı, asetilkolinin kronotropik yanıtlarına artmış olan duyarlılık ve azalan sempatik stimülasyon, diyabetik kalpte bradikardi oluşmasına yol açmaktadır. Buna ek olarak kalbin elektriksel özelliğindeki ve kalsiyum kullanımındaki değişiklikler de diyabetik bradikardiye neden olabilir [13]. Öte yandan, STZ ile indüklenen diyabetik sıçan kalp modelinde *in vitro* ve *in vivo* araştırmalarda, kalbin kasılma ve gevşeme işlevlerinin göstergesi olan $\pm dp/dt$ değerlerinin önemli ölçüde azaldığı saptanmıştır [14].

Diyabetik kalpte β -AR sayısındaki azalmanın, inotropik ve kronotropik yanıtların bozulmasına neden olabileceği öne sürülmektedir [15, 16]. Kardiyak β -AR reseptör sayısındaki azalmaya yol açan faktörler arasında hipotiroidizm ve artmış katekolamin *turnover*'ı ve buna bağlı olarak gelişen reseptör *down-regülasyonu* bulunmaktadır [13, 15]. Savarase ve Berkowitz yaptıkları çalışmada, STZ ile indüklenen diyabetik sıçan kalp modelinde, β -AR sayısında görülen %28'lik bir azalmanın kalp atım hızında % 24'lük bir azalmaya eşlik ettiğini belirlemiştir [16].

2. 8. Diyabetin Kardiyovasküler Hastalıklar Üzerindeki Etkisi

Diyabet, obezite, dislipidemi ve hipertansiyon, koroner arter hastalığı, kardiyak hipertrofi ve kalp yetmezliği için bağımsız birer risk faktörüdür [17, 18]. Bunun yanı sıra diyabetde spesifik bir kardiyomiopatinin varlığını ortaya konmuştur [19-21]. Miyokard hücrelerinde artan miyofibril sayısı, kas kitlesinde artışa sebep olmaktadır bu durumun sonucu olarak da, sol ventrikülde serbest duvar ve interventriküler septum kalınlıkları artmaktadır. Miyokardiyal hücrelerde görülen bu kitle artışının yanında, interstisyel ve perivasküler alanlarda da fibrotik değişiklikler görülmektedir [22]. Bunların sonucunda, kalbin diastolik ve sistolik fonksiyonlarında azalma görülürken, bunların hepsinden de önemli olarak, kalbin mikrosirkülasyonunda çok önemli değişiklikler görülmektedir. Hipertrofik kalplerde görülen ateroskleroz ve damar hastalığı, çeşitli yönleriyle hipertrofik olmayan hastalardan farklılıklar göstermektedir. Genellikle eşlik eden hipertansiyon bu hastalarda, sadece epikardiyal ana koroner arterlerde değil, küçük çaplı arterlerde de medial kalınlaşma ve intimal hasara yol açmaktadır [23, 24]. Ayrıca kalp kasındaki hipertrofiye oranla, kalbin damar ağındaki dağılım,

rölatif olarak yetersiz kalmaktadır [22]. Koroner arterlerdeki morfolojik değişikliklerin yanısıra, endotel ve damar duvarındaki müsküler hücrelerdeki biyokimyasal değişiklikler de yüksek koroner rezistanslara yol açmaktadır [25].

Çok sayıda çalışma, hiç vasküler hastalığı olmayan diyabetik hastalarda da sistolik ve diastolik fonksiyonun bozulduğunu göstermektedir [26-30]. Koroner kan akımında, endotel-bağımlı bozuklukların, diyabetin etkisiyle oluştuğu düşünülmektedir [30, 31]. Hücre-dışı matriksin değişmesi, sol ventrikülde sertliğe neden olmaktadır [32].

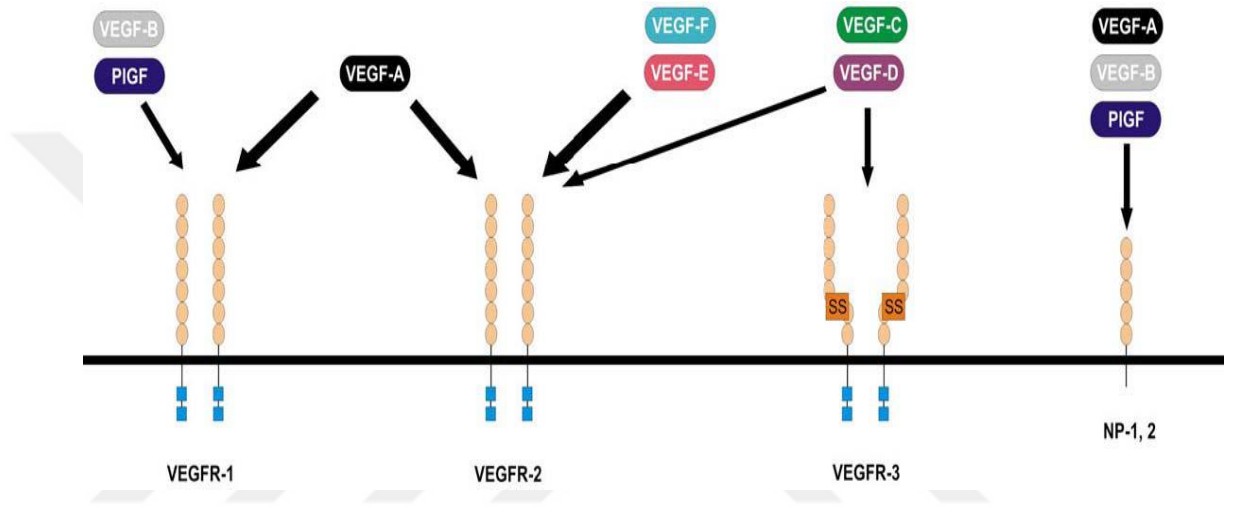
Diyabette, sol ventrikül hipertrofisi, genellikle hipertansiyona veya diyabete bağlı konsantrik hipertrofi olarak görülmektedir ve bu hastaların kalpleri, hipertrofisi bulunmayan koroner arter hastalarıyla morfolojik, histolojik ve fizyolojik yönleriyle önemli farklılıklar göstermektedir [24]. Örneğin patolojik anjiyogenez, kardiyak hipertrofide görülen önemli bulgulardan biridir. Anjiogenezi etkileyen çeşitli faktörler vardır, bunların başında da VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) gelir. VEGF'in, hem fizyolojik hem de patolojik angiogeneze ve lenfangiogeneze esansiyel rolü vardır [33-35].

2.9. Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF)

Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), anjiogeneze ve vasküler permeabilitede önemli rol oynayan bir faktördür [36]. Yetişkinlerde VEGF, bütün miyokardiyum ve büyük damarlar dahil olmak üzere tüm vasküler dokularda ekspresyonlanır [37]. VEGF, endotelial hücreler için bir mitojen ve çok fonksiyonlu bir sitokindir. VEGF'in mitojenik aktivitesi büyük oranda KDR (kinase domain region) tarafından kontrol edilir [38-40]. Bu ailenin üyeleri; VEGF-A (*Vascular permeability factor*), VEGF-B (*VEGF-related factor, VRF*), VEGF-C (*VEGF-related protein, VRP*), VEGF-D (*c-fos-induced growth factor, FIGF*), PGF (*Placental growth factor*,) VEGF-E' dir [41-43].

VEGF-A; anjiogenezi sağlamakta ve damarsal geçirgenliği artırmada çok önemlidir [44]. Yeni damar oluşumu ile hematojen metastazlarda rol oynar [45]. VEGF-B; VEGF-A ile aynı reseptör üzerinden etki gösterdiği için etkileri çok

benzerdir [46]. VEGF-C 4. kromozomda 4q34. 1-q34. 3 lokalizasyonunda, VEGF-D ise X kromozomunda Xp22. 31 lokalizasyonunda bulunan gen tarafından kodlanmaktadır. Aynı reseptör üzerinden etki ederler. Öncelikli görevi lenfanjiogenezisi indükleyip, düzenlemektir . İki faktörün arttığı tümöral dokularda peritümöral ve intratümöral lenfanjiyogenezde artış olduğu ve bunun sayesinde bölgesel lenfatiklerle bağlantı kurulup, lenfatik metastazların geliştiği gösterilmiştir [47].



Şekil 2. 1. VEGF izoformları ve reseptörleri [48].

Bu faktörlerin etki gösterdikleri reseptörler tirozin kinaz reseptörleri olup; VEGFR1 (*Flt-1*), (*fms- like tyrosin kinase*), VEGFR2 (*KDR, kinase insertdomain-containing receptör*), VEGFR3 (*Flt-4*)'dür [49, 50]. VEGFR1 ve VEGFR2 vasküler endotelde bulunurlar [51]. Anjiyogenezi indükleyerek etki gösterirler. VEGFR3 esas olarak lenfatik damar endotellerinde bulunur [52]. Lenfanjiyogenezi indükleyici rol oynar [53]. İntratümöral lenfatik damarların oluşumunu sağlayarak çevredeki bölgesel lenf damarları ile bağlantı kurduğu ve böylelikle lenfatik metastaz oluşumunu kolaylaştırdığı gösterilmiştir [54]. VEGF-A, VEGFR1 ve VEGFR2 üzerinden, VEGF-B ise VEGFR2 üzerinden etki göstererek angiogenezis sağlarlar [49, 55]. VEGF-C ve VEGF-D pre-pro-poliipeptidler olarak oluşur ve proteolitik işlemler sonrasında VEGFR3 afiniteleri artar. En matür hali ise VEGFR2'ye de etki edebilir. Böylelikle öncelikli olarak VEGFR3'e etki ederek lenfanjiyogenezi sağlar, VEGFR2'ye olan etkisi ile de aynı zamanda anjiyogenezi artırır [46, 56, 57]. VEGFR3, reseptörünün *VEGFR-3s (uzun)* ve *VEGFR3l (kısa)* olmak üzere insanda iki ayrı formu bulunur. Bu ayırım molekülde bulunan karboksil grubuna göre ayrılmaktadır. Uzun tip dominanttır. Uzun tipinde ek olarak üç tane tirozin (Tyr) grubu vardır ki, bunlardan Tyr 1337 otofosforilasyonda önemli rol oynar. VEGF-C ve VEGF-D, VEGFR3'e bağlandığında adaptör bir proteinin hızlı tirozin fosforilasyonu ile MAP kinaz aktivasyonu olur ve böylelikle hücre çoğalması, migrasyonu ve aktin reorganizasyonu ile lenfanjiyogenezi düzenlenir. VEGFR3 lenfanjiyogenezde etkisi gösterilebilen nadir moleküllerdendir. Erken embriyolojik dönemde bu reseptörün kardiovasküler sistem gelişiminde rol oynadığı ve gelişimin ilerleyen evrelerinde ise lenfatik damarlardaki endotel hücrelerinde sınırlı kalmakla beraber, çok eser miktarda kan damarlarının endotellerinde de varlığı gösterilebilmiştir. VEGFR3 ligandları VEGF-C ve VEGF-D ile birlikte lenfanjiyogenezde çok önemli rolü vardır (Şekil 2. 1.) [48, 58].

2. 10. VEGF Reseptörlerinin Aktivasyonu

VEGF'nin reseptörü ile birleşmesini takiben reseptöre G proteinleri de bağlanır ve fosfolipaz-C'yi aktifler. Aktiflenmiş fosfolipaz C'nin etkisi ile ikinci haberciler olan diaçilgliserol (DAG) ve inositol trifosfat (IP3) oluşur. DAG,

protein kinaz C'yi aktive eder. IP₃'de hücre içi kalsiyum seviyesini arttırıp, kalsiyum-kalmodulin kompleksi oluşturarak, kalmodulin kinazları aktive eder. Bir dizi hücre içi sinyal iletim proteinleri, bu kinazlar aracılığıyla, fosforile edilerek endotel hücrelerinin proliferasyon, migrasyon ve diferensiasyonu sağlanır. VEGF'nin reseptörlerine bağlanmasını, heparan sülfat proteoglikanları düzenlemektedir. Düşük heparin konsantrasyonu VEGF bağlanmasını arttırırken, yüksek heparin konsantrasyonun bağlanmayı azalttığı bildirilmiştir [59].

2. 11. VEGF Gen Ekspresyonunun Düzenlenmesi

İnsanlardaki VEGF geni kromozom 6p21.3 üzerinde yerleşmiştir. Kodlayıcı bölge ~14 kilobaytlık (Kb) bir alan kaplamaktadır ve 8 eksondan oluşmaktadır. Tek bir pre-mRNA'nın alternatif birleştirilmesi çok sayıda farklı VEGF türünü oluşturur [60].

VEGF, endotel hücre farklılaşması ve daha önceden mevcut olan damarlardan yeni kapillerlerin gelişmesi için gereklidir. Buna ek olarak, VEGF'in hücrenin yaşaması ve ciddi stres durumunda çoğalması için yaşamsal faktör olduğuna dair güçlü kanıtlar mevcuttur. Hipoksi; hem *in vivo*, hem *in vitro* ortamda VEGF geninin ekspresyonunda ana düzenleyicidir ve VEGF gen transkripsiyonunu indüklemektedir. VEGF geninde 28 baz çifti (bp) hipoksi yanıt elementi (HRE) transkripsiyonun başlangıç bölgesinin 1 kb karşısında yer almaktadır. Hipoksi durumunda VEGF geninin transkripsiyon aktivasyonu hipoksi ile indüklenebilen faktör-1 (HIF 1alfa/beta)'in bu elemente bağlanması aracılığı ile olmaktadır. HIF-1 alfa alt grubu oksijene hassas alt kısmıdır. Bunun aksine hipoksiye yanıt olarak VEGF'nin düzenlenmesinde transkripsiyon aktivasyonu tek mekanizma değildir. Hipoksi VEGF gen transkripsiyonunu, VEGF-mRNA'sının gen transkripsiyonunu ve VEGF-mRNA'nın stabilizasyonunu indüklemektedir. Hipoksinin yanısıra birçok sitokin, hormon ve büyüme faktörü VEGF, mRNA'nın değişik hücrelerde ekspresyonunda düzenleyici olabilir. Birçok sitokin, hormon ve büyüme faktörü değişik hücre tiplerinde VEGF-mRNA ekspresyonunu düzenleyebilir. Epidermal büyüme faktörü, transformasyon büyüme faktörü beta (TGF-beta) veya keratinosit büyüme faktörü, VEGF gen ekspresyonunda etkindir. İnterlökin 1 (IL-1) ve Prostoglandin E2 (PGE2)

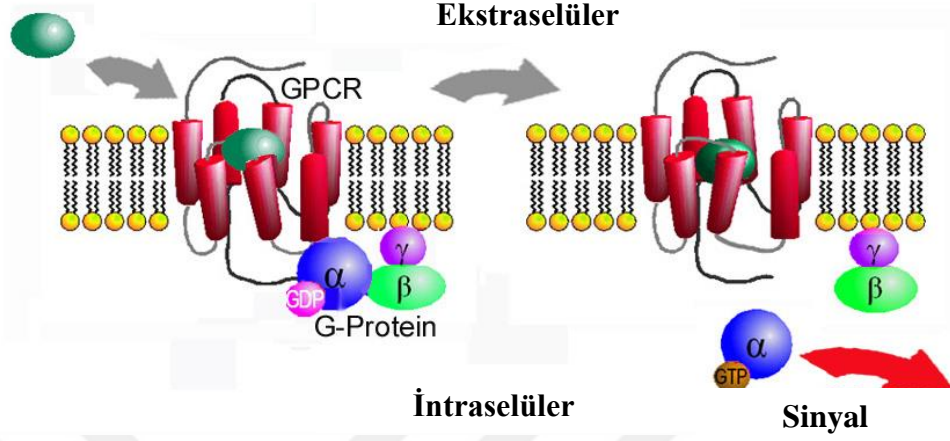
kültürdeki sinovyal fibroblastlar, VEGF ekspresyonunu indüklemekte ve bu da inflamasyondaki anjiogenezde bu tür inflamasyon mekanizmalarına katkıda bulunduğunu desteklemektedir [61]. İnsülin benzeri büyüme faktörünün, kültür ortamında kolorektal kanser hücrelerinde, VEGF-mRNA ve protein indüksiyonu yaptığı gösterilmiştir [62]. Tiroid stimüle edici hormon (TSH) ve Adrenokortikotropik hormonda (ACTH), *in vitro* ortamda VEGF gen ekspresyonunu indükleyebilmektedir [62, 63].

2. 12. G Proteinlerinin Yapısı

Çok sayıda hormonal sinyal iletiminde görev alan heterotrimerik G proteinleri α , β ve γ alt birimlerinden oluşmaktadır [64]. Bu alt birimlere ilişkin özellikler Tablo 2. 1'de gösterilmiştir. α -alt birimi, guanin nükleotitleri bağlayan diğer proteinlerle yapısal ve işlevsel benzerlikler gösterir ve birincil yapısı G proteinini tanımlar. β ve γ -alt birimleri birbirlerine sıkıca bağlıdırlar [65]. Her G proteininde, β ve γ kompleksi bulunmasına rağmen, G proteinleri α -alt birimlerine göre sınıflandırılır. α -alt birimi, guanin nükleotitlerinin (GDP veya GTP) bağlandığı yüksek ilgili tek bağlanma bölgesine sahiptir. α -alt biriminin GTP bağlı formu $\beta\gamma$ kompleksinden ayrılır, membran iç yüzeyinde geçiş yaparak efektör moleküllerle etkileşime girer ve hücrel yanıtı oluşturacak olan zincirleme tepkimeyi başlatır [66, 67]. Son yıllarda α -alt birimi gibi $\beta\gamma$ kompleksinin de, bazı efektör moleküllerle etkileşime girebildiği ve bu moleküllerin etkinliğini değiştirebildiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir [68].

G proteinleri GDP durumunda iken heterotrimerik ($\alpha\beta\gamma$) yapıdadır ve reseptör ya da efektörle etkileşim halinde değildir. Ligandın reseptörle bağlanması ile reseptörde yapısal bir değişim gerçekleşir ve G proteininin bağlanması için, GDP' de yer alan, yüksek afiniteye sahip reseptör bölgesi açığa çıkar [69]. G proteini ile ligand tarafından uyarılmış reseptör arasındaki etkileşimin çok sayıda bölge üzerinden olduğu ve G proteinin reseptör tarafından uyarılması ile $G\alpha$ 'da GDP'nin GTP ile yer değiştirdiği bilinmektedir [70]. GTP'nin bağlanması ile, α -alt biriminin reseptöre ve $\beta\gamma$ kompleksine ilgisi azalır, $G\alpha$ -GTP, $\beta\gamma$ - alt biriminden ayrılarak etkinleşir ve bir efektör molekülü ile etkileşime girer. GTPaz aktivitesi ortaya çıkmasıyla GTP'yi GDP'ye hidrolizler ve G proteinini aktif olmayan

dinlenme durumuna döndürür. ($G\alpha$ -GDP) efektörden ayrılarak, $\beta\gamma$ -alt birimi ile bir araya gelir [66, 69]. (Şekil 2.2.)



Şekil 2. 2. G proteini ve alt üniteleri [71]

Çeşitli G proteinlerinin birincil yapıları arasında benzerliklerin araştırılması sonucu yüksek derecede benzerliğe sahip birkaç bölge ortaya çıkarılmıştır [68]. Bu bölgeler şunlardır;

a) P Bölgesi: Hidrolitik süreçlerde görev aldığı sanılmaktadır. Bu bölgenin bağlı GDP'nin α ve β fosforil gruplarına yakın olması ve Gly→Val mutasyonunun GTPaz aktivitesinin kaybolmasına neden olması bu varsayımı güçlendirmektedir.

b) E Bölgesi: Efektör molekülü ile etkileşime girmesi nedeniyle E bölgesi olarak adlandırılmaktadır. Ras p21 proteinin E bölgesindeki mutasyonlar, GTP bağlama özelliğini etkilememektedir, transformasyon etkinliğinin yok olmasına neden olmaktadır.

c) G Bölgesi: Bütün GTP-bağlayan proteinlerde korunan bu bölge, GTP'nin guanin halkası ile doğrudan etkileşime girmektedir.

d) G' Bölgesi: Birçok GTP-bağlayan proteinde yüksek oranda korunmuştur. Bu bölgenin GDP veya GTP bağlı durumlar arasındaki yapısal değişimde görev aldığı sanılmaktadır.

e) G'' Bölgesi: GTP' nin guanin halkasına yakın bir bölgesidir [70].

2. 13. G Proteinin α -Alt Birimlerinin Yapısı

Tüm α -alt birimleri kendi başlarına birer enzimdirler. Bu proteinler içsel GTPaz etkinliğine sahiptirler ve bağlı GTP'nin son fosfatını hidrolizleyerek, bağlı GDP ve serbest fosfat (Pi) oluşmasını sağlarlar. Günümüze kadar 20 farklı G protein α -alt birimi tanımlanmıştır [72, 73]. α -alt birimleri 39-52 kDa molekül ağırlığında bir protein ailesidir. Amino asit dizilişi olarak aralarında % 45-80 oranında benzerlik vardır. Birincil yapılarının farklılığı yanında, üç boyutlu yapıları da farklıdır [74]. Son yıllarda G proteinlerinin yapı ve işlev bağlantısını açıklamak için değişik çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Ayrıca $G\alpha$ - $G\beta\gamma$ etkileşimi ve GTP-hidrolizini belirleyen etmenler gibi birçok soruya yanıt aranmıştır. Bu çalışmalar, α -alt biriminin GTPaz bölgesi ve α -heliks bölgesi olmak üzere iki bölgeden oluştuğunu ortaya koymuştur [73]. GTPaz bölgesi, GTPaz ailesine üye tüm proteinlerde ortaktır ve altı uzun β -şeridi çevreleyen beş α -heliks'ten oluşmuştur. Heterotrimerik G proteinlerine özgün α -heliks bölgesi ise tümüyle α -heliks yapıdadır [75]. GTPaz bölgesi, reseptör, efektör ve $\beta\gamma$ -alt birimleri bağlama bölgesi içerir. α -heliks bölgesinin işlevi ise henüz açıklığa kavuşmamıştır [70] (Tablo 2.1).

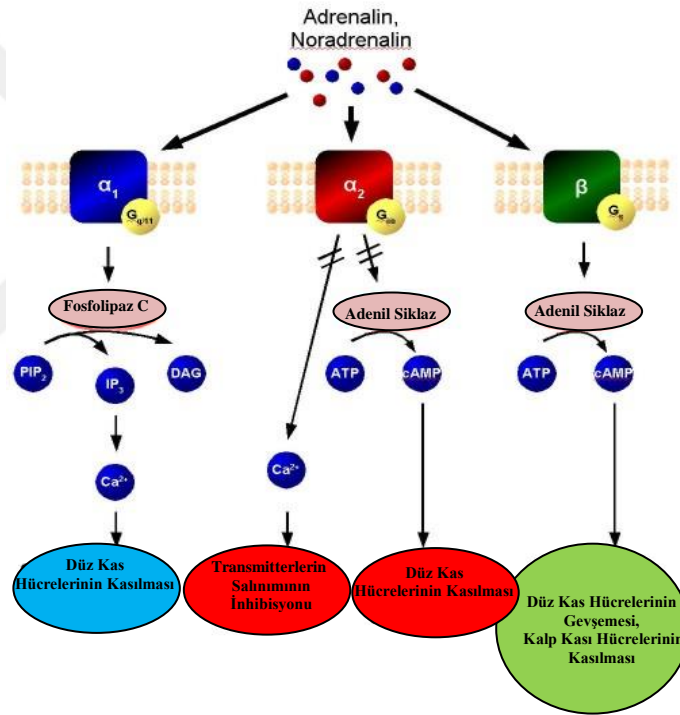
Tablo 2. 1. Memeli G proteini α -alt birimleri

AİLE	ALT TİP	EKSPRESYON YERİ	EFEKTÖRLER
$G\alpha_s$	$G\alpha_{sS}$	Koku epiteli hücreleri	Adenilat siklaz \uparrow
	$G\alpha_{sL}$	Retinal koni hücreleri	Ca^{+2} kanalı \uparrow
	$G\alpha_{olf}$	Koku epiteli	Adenilat siklaz \uparrow
$G\alpha_{i/o}$	$G\alpha_{gust}$	Tat hücreleri	?
	$G\alpha_{t-r}$	Retinal çubuk tat hücreleri, tat hücreleri	cGMP fosfodiesteraz \uparrow
	$G\alpha_{t-c}$	Retinal koni hücreleri	cGMP fosfodiesteraz \uparrow
	$G\alpha_{i2}$	Tat hücreleri	Adenilat siklaz (tip I, V, VI) \downarrow
	$G\alpha_{o1}$	Nöron, nöroendokrin hücre	Ca^{+2} kanalı (L-/N-tipi) \downarrow
$G\alpha_{o2}$	Nöron, nöroendokrin hücre	Ca^{+2} kanalı (L-/N-tipi) \downarrow	

2. 14. G Proteinlerinin α -Alt birimlerinin Çeşitleri

α -alt birimlerine göre G proteinleri $G\alpha_s$, $G\alpha_{i/o}$, $G\alpha_q$, $G\alpha_{12}$ olmak üzere dört aileye ayrılır. G_s proteini adenilat siklaz etkinliğini artırarak görev yapar. Adenilat siklaz etkinliğinin artmasıyla cAMP sentezi artar ve cAMP ikincil haberci olarak hücre içi yanıtı başlatır. Hücre içi yanıtının sonlanması GTP'nin hidrolizlenmesiyle gerçekleşir. Ancak bazı patolojik durumlarda bu mekanizma aksayabilir. G_i proteini adenilat siklaz aktivitesini baskılayarak cAMP seviyesini düşürür [76]. Burada da bazı patolojik durumlarda bu mekanizmanın aksaması olasıdır. G_q proteini fosfolipaz C enzimini etkinleştirir. Bu enzim ise PIP2 parçalayarak IP3 ve DAG oluşmasını sağlar [77]. DAG protein kinazları uyarırken, IP3 ise iyon kanallarını etkinleştirir. Bu gruba dahil olan G_{16} proteini hematopoetik hücrelerin sadece belli bir alt grubunda bulunmasına rağmen işlevsel olarak farklı birçok reseptör tarafından etkinleştirilebilmektedir. G_{12} ile ilgili yapılmış çok fazla çalışma yoktur. $G\alpha$ 'nın reseptörlerle etkileşiminin üç bölgede gerçekleştiği ileri sürülmektedir. Reseptörün etkinleşmesi sonucu $\beta\gamma$ kompleksinden ayrılan α -alt biriminin birçok ikincil haberci ile etkileşime girdiği ve onları düzenlediği bilinmektedir. Efektör-G protein etkileşiminin $G\alpha$ 'nın arka

yüzünde ki bölgede olduğu düşünülmektedir. Yapılan çalışmalar, adenilat siklazı uyaran bölgenin G α s'ın karboksil ucunda 235-356 bölgesinde bulunduğunu göstermiştir [78]. Bu bölgedeki kalıntılara ilişkin mutasyonlar adenilat siklazı uyarma yeteneğinde azalmaya neden olmaktadır. α -alt biriminin amino ucunun $\beta\gamma$ -alt birimi ile etkileşime giren bölge olduğu düşünülmektedir[79]. α -alt biriminin amino ucundan 2 kDa'luk bir parçanın tripsinle uzaklaştırılmasından sonra α -alt biriminin $\beta\gamma$ -alt birimi ile birleşme özelliği yok olmaktadır. Özellikle 7-10 amino asitlerin birleşme için önemli olduğu düşünülmektedir. Yapılan çalışmalar, 50-60 kalıntılar civarındaki bir bölgenin de etkileşimler açısından önemli olduğunu düşündürmektedir [77-79]. (Şekil 2.3.)



Şekil 2. 3. G α alt üniteleri ve etkileri [80]

G α 11'in fizyolojik düzeydeki koroner damarların fonksiyonları ile kalp hipertrofisi gibi patolojik süreçler ile ilgili olduğu bilinmektedir [81, 82]. Ancak, koroner anjiogenez ve kalp hipertrofisinde VEGF ekspresyonu ve fosforilasyonu üzerine etkileri henüz araştırılmamıştır.

MATERYAL VE METOT

3. 1. Denekler

Çalışmamız normal ve G protein $G\alpha 11$ 'den yoksun 64 dişi C57BL6 fare üzerinde gerçekleştirildi. C57BL6 normal tip fareler Charles River Laboratories'den (Sulzfeld, Germany) temin edildi. Tüm denekler 12 saat gece, 12 saat gündüz siklusunda ve her kafeste 4 denek olacak şekilde sınırsız yem ve su ile beslendi. Denekler üzerinde yapılan tüm işlemler Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Bakım-Kullanım ve Hayvan Etik Kurulu tarafından değerlendirilmiş ve onaylanmıştır (2014.08.02).

3. 2. Deney Grupları

Denekler randomize olarak dört gruba ayrıldı (Tablo 3. 1).

Tablo 3. 1. Deney grupları

	Streptozotosin enjeksiyonu	Denek sayısı
Normal-tip + Nondiyabetik (WT-NDM)	-	16
Normal-tip + Diyabetik (WT-DM)	+	16
$G\alpha 11$ geninden yoksun + Nondiyabetik (KO-NDM)	-	16
$G\alpha 11$ geninden yoksun + Diyabetik (KO-DM)	+	16

3. 3. Diyabetin Oluşturulması ve Diyabet Oluşumunun Tespiti

8 haftalık farelere intraperitoneal olacak şekilde tek doz Streptozotosin (0.1 mol/L sitrat tamponu, pH 4. 5 (130 mg/kg)) veya sadece taşıyıcı (0.1 mol/L sitrat tamponu) verildi. Deneklerin enjeksiyon bölgesi iyot solusyonu ile silindi. Daha sonra dozu denek ağırlığına göre ayarlanmış olan streptozotosin 25G kalınlığındaki iğne yardımıyla intraperitoneal olarak verildi. Sitrat tamponu verilen denekler ise kontrol olarak belirlendi.

Diyabet oluşumunun teyit edilmesi amacıyla, streptozotosin enjeksiyonundan 24 saat sonra kan glukoz seviyesi deneklerin kuyruk veninden alınan kanda (2 μ l) bir glukometre (GlucoMen, GlycÓ, A. Menarini Industrie, Farmaceutische) kullanılarak ölçüldü. Daha sonra glukoz seviyeleri ve vücut

ağırlıkları haftalık olarak kayıt edildi. Sonuç olarak, 8 hafta boyunca kan glukoz seviyeleri 300 mg/dl'den fazla olan deneklerin diyabet oldukları kabul edildi.

3.4. Kardiyak Hipertrofinin Tespiti

8.haftanın sonunda tüm deney gruplarındaki deneklerin elektrokardiyografileri çekildi. Bu işlem anestezi altında ultrasonik sistemle (iE33, Philips Medical Systems, Andover, MA, USA) yapıldı ve deneklerin LVEDD (Left ventricular end-diastolic dimension), LVPW (Left ventricular posterior wall thickness), LVM (Left ventricular mass), LVESD (Left ventricular end-sistolik dimension) değerlerinin ölçümü kaydedildi.

3.5. Deneklerin Sakrifikasyonu ve Doku Eldesi

Diyabetin oluşturulmasından 8 hafta sonra denekler servikal dislokasyon ile sakrifiye edildi. Torakotomi yapılarak kalp çıkarıldı ve 0.1 M fosfat tamponlu salin (PBS) (pH 7.4, +4°C'de 24 saat) içerisinde çözünmüş olan %4'lük 0.1 M PBS ile dokular yıkadıktan sonra örnekler kriyokoruma amacıyla %20'lik sakkaroz (0.1 M PBS, pH 7.4, 48 saat, +4°C) içerisinde bekletildi. Ardından örnekler kriyomatrikse (Tissue-Tek) gömüldü ve 7 µm kalınlığında olacak şekilde kriyostatla (Leica 1005, Leica, Oberkochen, Germany) seri kesitleri alındı.

3.6. İmmünohistokimyasal Boyama

İmmünohistokimyasal boyamada aşağıda belirtilen antikorlar kullanıldı:

1) Primer antikorlar

Santa Cruz Biotechnology

- a) Flk-1 (C-1158) rabbit polyclonal antibody against amino acids sequence of Flk-1 of mouse: sc-504
- b) p-Flk-1 (Tyr 951) rabbit polyclonal antibody against amino acids sequence phosphorylated Tyr 951 of Flk-1 of human: sc-16628-R

Cell Signaling

- a) VEGFR Receptor 2 (55B11) Rabbit mAb. Rabbit monoclonal antibody against C-terminal amino acid sequence of human VEGFR2

b) phospho-VEGF Receptor 2 (Tyr951) (15D2) Rabbit mAB. Rabbit monoclonal antibody against amino acid sequence phosphorylated Tyr 951 of human VEGFR2.

2) Sekonder antikor
Goat anti Rabbit IgG (Vector Labs.)

İmmünohistokimyasal analiz için kullanılan reaktifler

Bovine Serum Albumin (Sigma)

Normal Goat Serum (Vector Labs.)

Seri alınan kesitlerde, Avidin-Biyotin-Peroksidaz kompleksi metodu ile immünohistokimyasal boyama yapıldı. Bunun için öncelikle kesitler 2x15 dakika 0.05 M TBS (Tris-buffered salin, pH 7.6) ile yıkandı. Endojen peroksidaz aktivitesinin yok edilmesi için kesitler %0.3'lük H₂O₂ ile 20 dakika karanlıkta inkübe edildi. Spesifik olmayan bağlanmaların engellenmesi amacıyla kesitler sırasıyla %1'lik sığır serum albumin (BSA) ve %10'luk normal keçi serumu (NGS) ile yıkandı. Ardından +4°C'de 24 saat, öncelikle kesitler primer monoklonal antikor [(t-VEGFR, 1:500; Cell Signaling) (p-VEGFR2, 1:250; Cell Signaling)] ve primer poliklonal antikor (primary polyclonal rabbit antibodies against t-VEGFR2 (Santa Cruz) ve p-VEGFR2 (Santa Cruz) ile daha sonra da biyotin ile konjuge olan anti-rabbit IgG (1:500, Vector Laboratories) ile inkübe edildi. Bu inkübasyonlardan sona kesitler, %0.01'lik H₂O₂ ve %0.01'lik nikel amonyum sülfat içeren, 0.05 M Tris-HCl tampon (pH 7.6) içerisinde hazırlanmış olan, %0.05'lik 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) (Sigma) ile görünür hale getirildi. Seri kesitler negatif kontrol amacıyla primer ve sekonder antikor içermeyen solüsyonlarla inkübe edildi. Daha sonra 2x15 dakikalık yıkama işlemi tekrarlandı ve sonrasında 3'er dakika süreyle %50, 70, 80, 90, 95 ve 100'lük etanol serisinden geçirildi. Kesitler I. ksilolde 2 ve II. ksilolde 4 dakika bekletilip entellan kullanılarak lamel ile kapatıldı.

3.7. İmmünohistokimyasal Boyanmaların Dansitometrik Analizi

Total ve fosforile VEGFR2 formlarının koroner damarlardaki boyanma dereceleri dansitometrik analiz ile belirlendi. Bu analiz için gri ölçüm değerleri alındı ve bu değerler arka plan değeri olarak belirlendi. Bu değerlerin tüm kesitlerde ölçüme başlamadan önce aynı olmasına dikkat edildi. Daha sonra, damar içeren alanların resimleri çekildi. DAB ile boyanmış damar kesitlerinde ölçüm yapıldı. Bu ölçüm için ışık mikroskobuna (Zeiss Axioscop-2) bağlı olan bilgisayardaki görüntü analiz yazılımı (Axiovision Version 4.7, Carl Zeiss Jena, Germany) kullanıldı. Öncelikle doku örneğinin olmadığı (sadece lam-lamel olan bölgede) dört alandan analiz için ölçüm yapıldı. Kesit içeren bölgedeki dansitometrik değer (dört alandaki dansitometrik ölçüm değerinin ortalaması) ile doku içermeyen alandaki dansitometrik değer (dört alandaki dansitometrik ölçüm değerinin ortalaması) çıkarılması sonucunda, gerçek dansitometrik değere ulaşıldı. Bu ölçüm her gruptaki tüm deneklere ait doku kesitlerinde tekrarlandı.

3.8. Western Blot Analizi

Torakotomi ile çıkarılan kalp dokularından, protein izolasyonu yapıldı sonrasında Western blot tekniği ile total ve fosforile VEGFR2 proteinlerinin, diyabetik ortamda ve G-protein $G\alpha_{11}$ genin etkisi altındaki ekspresyonel değişimleri gösterildi. Yapılan işlemler aşağıda belirtildiği gibi uygulanmıştır:

Doku ekstraktı hazırlamak için, alınan doku örnekleri üzerine T-PER (Pierce) örnek tamponu eklendi ve homojenizatörde 5 dakika parçalanıp homojenize edildi. Örneklerin içerdikleri protein miktarları tespit edilerek, yükleme solüsyonu ile 1/1 oranında karıştırıldıktan sonra, 5 dakika boyunca 95°C'de su banyosunda kaynatıldı.

Proteinin kD ağırlığı dikkate alınarak %10'luk jel hazırlanıp, 30 µg /ml oranında protein içeren numuneler yüklendi. Elektroforezde numuneler ilk önce 120V ve 30mA'de 20 dakika, sonrasında ise 80V ve 30mA'de jelin sonuna kadar yürütüldü. Elektrofezin ardından jeldeki proteinleri membrana aktarmak için

immunoblotting yapıldı. Blotlama işlemi 15V ve 90mA'de gece boyu +4°C'de gerçekleştirildi. Proteinlerin PVDF transferinden sonra, pH'sı 7.4 olan, % 0.1 Tween-20 ilaveli Tris Buffer Solüsyonu (TBS-T) ile yıkama yapıldı. Membran 1,5 saat süre ile oda ısında TBS-T ile hazırlanan % 5'lik yağsız süt tozu ile bloklandı. Bloklamanın ardından, 5 dakika TBS-T ile yıkanan membran, daha sonra %5'lik BSA (5 gr bovin serum albumin 100ml TBS-T içerisinde çözülerek hazırlandı) içerisinde dilüe edilmiş primer antikor ile +4°C'de gece boyu karıştırıcı üzerinde inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında TBS-T ile 3 kez 10 dakika yıkanarak, % 5'lik yağsız süt tozu ile hazırlanan sekonder antikorla oda sıcaklığında karıştırıcı üzerinde 1,5 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında TBS-T ile 3 kez 10 dakika yıkanıp kemiluminisans ile 5 dakika karanlıkta inkübe edilip, karanlık odada membrandaki protein bantları hiperfilme aktarıldı. Film geliştirici ve fiksatiften geçirilip, distile su ile yıkanıp ardından kurutuldu. Tüm bu işlemler ayrı ayrı total ve fosforile VEGFR2 ve β -aktin antikorları için de tekrarlandı.

3. 9. Veri Analizi

Bütün veriler ortalama \pm standart sapma olarak hesaplandı. İstatistiksel analizler Kruskal Wallis testi (*post hoc* test olarak Bonferroni testi) kullanıldı. Bonferroni testi öncesinde istatistiksel anlamlılık düzeyi (*p* değeri) 0.05 olarak belirlendi. Western blot analizi için ise Sigma Stat for Windows, version 3.0 (Jandel Scientific Corp. , San Rafael, CA) yazılımı kullanılırken anlamlılık seviyesi $p < 0.05$ olarak belirlendi. Tüm analizlerde GraphPad Prism version 5.0 (GraphPad Software, Inc, San Diego, Calif) adlı yazılım kullanıldı.

BULGULAR

4.1. Kan Glukoz Seviyeleri

Kan glukoz seviyeleri Tablo 4.1'de belirtilmiştir. Çalışmanın başlangıcında deney gruplarının kan glukoz seviyeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı ($p>0.05$) tespit edildi. Streptozotosin enjekte edilen deney gruplarında (WT-DM; 415 ± 20 mg/dL, KO-DM; 420 ± 18 mg/dL) ise istatistiksel olarak anlamlı seviyede kan glukoz düzeyinde artış gözlemlendi. (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Diyabet oluşturulan deney gruplarında kan glukoz düzeyleri (mg/dL).

	Streptozotosin Enjeksiyonu		Sonrası		
	3. Gün	14. Gün	28. Gün	42. Gün	56. Gün
WT-DM	350 ± 15	390 ± 20	410 ± 31	413 ± 32	415 ± 20
KO-DM	367 ± 16	389 ± 21	412 ± 23	415 ± 32	420 ± 18

4.2. Diyabetin ve $\alpha 11$ Geninin Kalp Hipertrofisine Olan Etkisi

8. hafta sonunda yapılan elektrokardiyografi ölçüm sonuçları Tablo 4.2'de belirtildiği gibidir. Diyabetin etkisiyle sadece WT-DM ve KO-DM gruplarında diastolik ve sistolik, LVEDD (Left ventricular end-diastolic dimension), LVPW (Left ventricular posterior wall thickness), LVM (Left ventricular mass), LVESD (Left ventricular end-sistolik dimension) değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu ($p<0.05$) tespit edildi. Diğer gruplarda ise istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik gözlemlenmedi. Dolayısıyla diyabetin ve $\alpha 11$ geninin kardiyak hipertrofinin oluşmasında etkili olduğu sonucuna varıldı.

Tablo 4. 2. Elektrokardiyografi sonuçları.

	WT-NDM (n=16)	WT-DM (n=16)	KO-NDM (n=16)	KO-DM (n=16)	
Sistolik	Septum (mm)	1.54 ± 0.05	1.78 ± 0.02†	1.58 ± 0.08	1.76 ± 0.05*
	LVESD (mm)	1.69 ± 0.07	1.4 ± 0.18 †	1.71 ± 0.13	1.48 ± 0.13*
	LVPW (mm)	1.29 ± 0.02	1.7 ± 0.03 †	1.24 ± 0.05	1.83 ± 0.05*
Diastolik	Septum (mm)	0.71 ± 0.04	1.03 ± 0.04†	0.84 ± 0.05	1.2 ± 0.05*
	LVEDD (mm)	3.87 ± 0.08	3.15 ± 0.13 †	3.79 ± 0.14	3.05 ± 0.13*
	LVPW (mm)	0.82 ± 0.03	1.12 ± 0.06 †	0.82 ± 0.05	1.13 ± 0.06*
	LVM (mg)	97 ± 6	125 ± 11 †	106 ± 5	126 ± 9*

†, p<0.05 WT-DM ile WT-NDM karşılaştırıldığında

*, p<0.05 KO-DM ile KO-NDM karşılaştırıldığında

4.3. Kantitatif İmmünohistokimyasal Analiz

Çalışma gruplarına ait örneklerin, kantitatif immünohistokimyasal analizi sonucu aşağıdaki bulgular tespit edildi.

4.4. Koroner Damarlarda t-VEGFR2'nin Ekspresyonu

Diyabetin VEGFR2'in ekspresyonunda istatistiksel bir azalma oluşturduğu tespit edildi. Diyabetin etkisiyle WT-DM (WT-DM; 436.1 ± 35.1 dansitometrik ünite) grubundaki VEGFR2'nin ekspresyonun, WT-NDM (WT-NDM; 722 ± 31.8 dansitometrik ünite) grubuna göre, istatistiksel olarak daha az ($p<0.05$) bir boyanma yoğunluğuna sahip olduğu belirlendi. Ayrıca KO-NDM (KO-NDM; 317.2 ± 36.8 dansitometrik ünite) grubundaki VEGFR2'nin ekspresyonunda, KO-DM grubuna (KO-DM; 264.5 ± 35.8 dansitometrik ünite) göre, istatistiksel olarak daha yüksek ($p<0.05$) bir boyanma yoğunluğu tespit edildi. WT-DM (436.1 ± 35.1 dansitometrik ünite) ve KO-DM (264.5 ± 35.8 dansitometrik ünite) grupları arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark ($p<0.05$) tespit edildi.

KO-NDM (317.2 ± 36.8 dansitometrik ünite) ve KO-DM (264.5 ± 35.8 dansitometrik ünite) gruplarında WT-NDM (722 ± 31.8 dansitometrik ünite) ve WT-DM (436.1 ± 35.1 dansitometrik ünite) gruplarına göre daha zayıf bir boyanma yoğunluğu tespit edildi. Diyabet ile birlikte normal farelerde VEGFR2

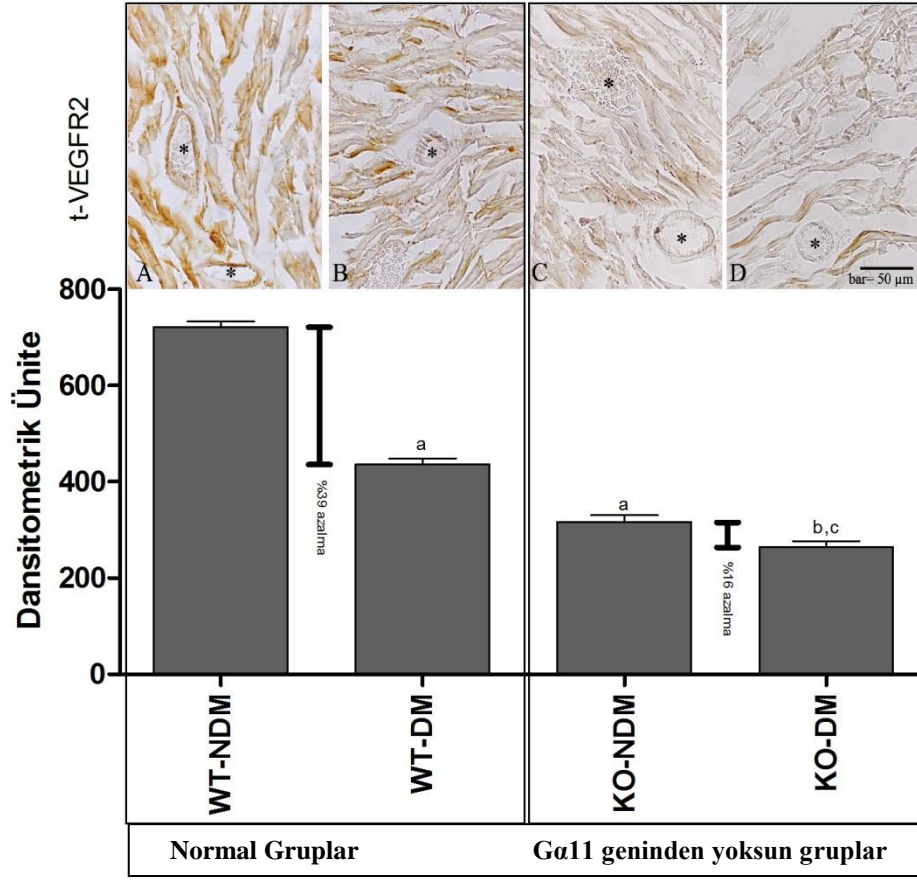
ekspresyonunda %39'luk bir azalma gözlenirken Gα11 geninden yoksun farelerde ise %16'lık bir azalma gözlemlendi. Sonuç olarak en düşük VEGFR2 ekspresyonunun Gα11 geninden yoksun diyabetik deneklerde olduğu gözlemlendi (Şekil 4.1, Tablo 4.3).

Tablo 4. 3. Kroner damarlarda t-VEGFR2'nin ekspresyonu

GRUP	t-VEGFR2 ekspresyonu (Dansitometrik ünite)	Denek sayısı
Normal-tip + Nondiyabetik (WT-NDM)	722 ± 31.8	16
Normal-tip + Diyabetik (WT-DM)	436.1 ± 35.1 *	16
G-protein Gα11 yoksun + Nondiyabetik (KO-NDM)	317.2 ± 36.8	16
G-protein Gα11 yoksun + Diyabetik (KO-DM)	264.5 ± 35.8 **	16

*, p<0.05 WT-NDM ile WT-DM karşılaştırıldığında

**, p<0.05 KO-NDM ile KO-DM karşılaştırıldığında



Şekil 4. 1. Koroner damarlarda VEGFR2'nin total formunun lokalizasyonu ve boyanma yoğunluğunun dansitometrik analizi.

A: WT-NDM, B: WT-DM, C: KO-NDM, D: KO-DM. a; WT-NDM grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel farklılığı göstermektedir, b; WT-DM grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel farklılığı göstermektedir, c; KO-NDM grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel farklılığı göstermektedir. Bar: 50 μ m. *; kroner damarları göstermektedir.

4. 5. Koroner Damarlarda p-VEGFR2'nin Ekspresyonu

VEGFR2'nin fosforile formunun ekspresyonu ile ilgili bulguların, VEGFR2'nin total formunun ekspresyonu ile ilgili bulgularla aynı çizgide olduğu tespit edildi. Koroner damarlardaki en yüksek fosforile VEGFR2 ekspresyonu WT-NDM grubunda (661 ± 33.1 dansitometrik ünite), diyabetin etkisiyle daha düşük fosforile VEGFR2 ekspresyonunun ise WT-DM grubunda (366 ± 34.5 dansitometrik ünite) olduğu tespit edildi (Şekil 4. 2).

KO-NDM (261.1 ± 34.6 dansitometrik ünite) ve KO-DM (229.5 ± 33.7 dansitometrik ünite) gruplarında, WT-NDM (661 ± 33.1 dansitometrik ünite) ve

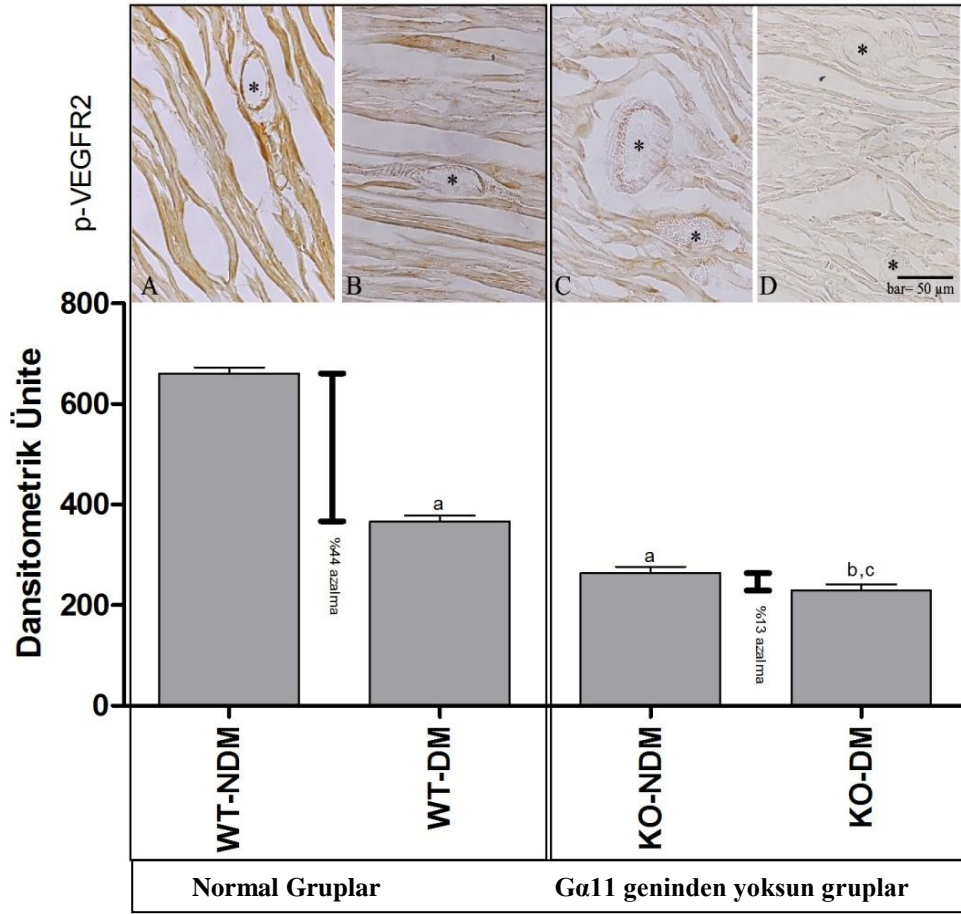
WT-DM (366 ± 34.5 dansitometrik ünite) gruplarına göre daha zayıf bir boyanma yoğunluğu tespit edildi. Diyabet ile birlikte WT farelerde, VEGFR2 ekspresyonunda %44'lük bir azalma gözlemlenirken, KO farelerde ise %13'lük bir azalma gözlemlendi. En düşük VEGFR2 ekspresyonu G α 11'den yoksun diyabetik deneklerde (KO-DM; 229.5 ± 33.7) gözlemlendi (Şekil 4.2, Tablo 4.4).

Tablo 4. 4. Kroner damarlarda p-VEGFR2'nin ekspresyonu

GRUP	t-VEGFR2 ekspresyonu (Dansitometrik ünite)	Denek sayısı
Normal-tip + Nondiyabetik (WT-NDM)	661 ± 33.1	16
Normal-tip + Diyabetik (WT-DM)	366 ± 34.5 *	16
G-protein G α 11 yoksun + Nondiyabetik (KO-NDM)	261.1 ± 34.6	16
G-protein G α 11 yoksun + Diyabetik (KO-DM)	229.5 ± 33.7 **	16

*, $p < 0.05$ WT-NDM ile WT-DM karşılaştırıldığında

**, $p < 0.05$ KO-NDM ile KO-DM karşılaştırıldığında



Şekil 4.2. Koroner damarlarda VEGFR2'nin fosforile formunun lokalizasyonu ve boyanma yoğunluğunun dansitometrik analizi.

A: WT-NDM, B: WT-DM, C: KO-NDM, D: KO-DM. a; WT-NDM grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel farklılığı göstermektedir, b; WT-DM grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel farklılığı göstermektedir, c; KO-NDM grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel farklılığı göstermektedir. Bar: 50 µm. *; kroner damarları göstermektedir.

4. 6. Kalp Kası Liflerinde t-VEGFR2'nin Ekspresyonu

Diyabetin miyokardiyal kas liflerinde VEGFR2'in ekspresyonunda istatistiksel bir azalma oluşturduğu tespit edildi. WT-NDM grubundaki VEGFR2'nin ekspresyonunun (WT-NDM; 755.7 ± 38.9 dansitometrik ünite), WT-DM grubuna (WT-DM; 426.1 ± 34.2 dansitometrik ünite) göre, istatistiksel olarak daha fazla ($p < 0.05$) bir boyanma yoğunluğuna sahip olduğu tespit edildi. Diyabet etkisi ile VEGFR2 ekspresyonunda yaklaşık olarak %44'lük bir azalma görüldü (Şekil 4. 3).

Ayrıca KO-NDM grubunda VEGFR2'nin ekspresyonun (KO-NDM; 320 ± 33.8 dansitometrik ünite), KO-DM grubuna (KO-DM; 269.5 ± 15.2 dansitometrik ünite) göre istatistiksel olarak daha yüksek ($p<0.05$) bir boyanma yoğunluğuna sahip olduğu tespit edildi. WT-DM (426.4 ± 34.2 dansitometrik ünite) ve KO-DM grupları (269.5 ± 15.2 dansitometrik ünite) arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark ($p<0.05$) tespit edildi (Şekil 4. 3).

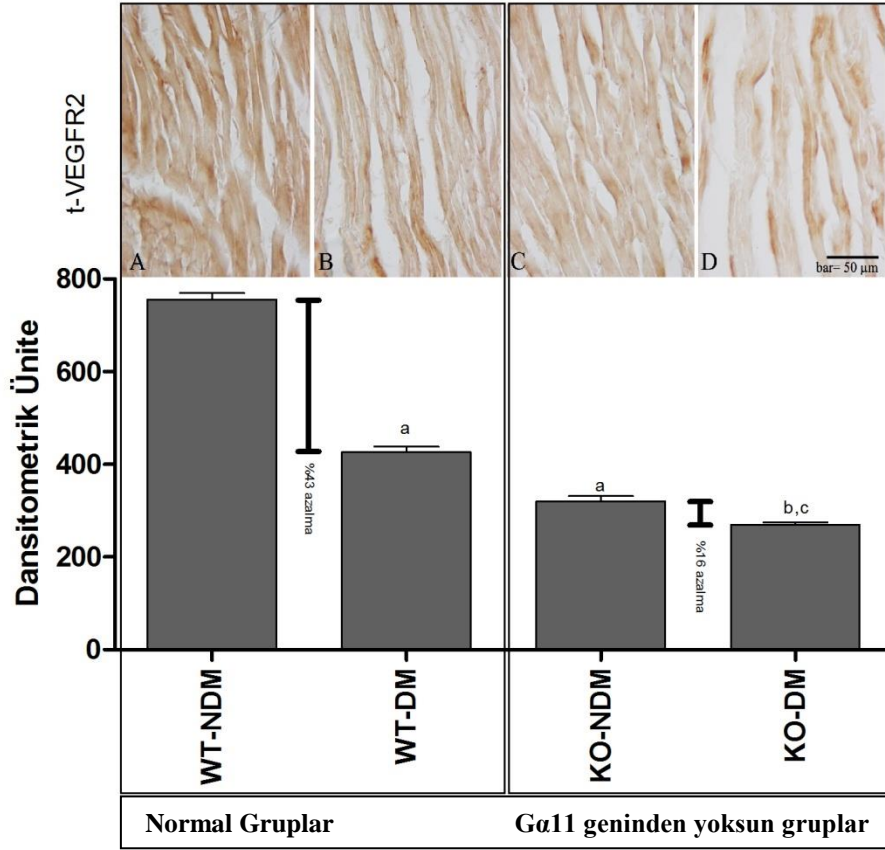
KO-NDM (320 ± 33.8 dansitometrik ünite) ve KO-DM (269.5 ± 15.2 dansitometrik ünite) gruplarında, WT-NDM (755.7 ± 38.9 dansitometrik ünite) ve WT-DM (426.4 ± 34.2 dansitometrik ünite) gruplarına göre, daha zayıf bir boyanma yoğunluğu tespit edildi. Diyabet ile birlikte normal farelerde VEGFR2 ekspresyonunda %43'lük bir azalma gözlenirken, Gα11'den yoksun farelerde ise %16'luk bir azalma gözlemlendi. En düşük VEGFR2 ekspresyonu, Gα11'den yoksun diyabetik deneklerde tespit edildi (Şekil 4. 3, Tablo 4. 5).

Tablo 4. 5. Miyokardiyal kas liflerinde t-VEGFR2'nin ekspresyonu

GRUP	t-VEGFR2 ekspresyonu (Dansitometrik ünite)	Denek sayısı
Normal-tip + Nondiyabetik (WT-NDM)	755.7 ± 38.9	16
Normal-tip + Diyabetik (WT-DM)	426.1 ± 34.2 *	16
G-protein Gα11 yoksun + Nondiyabetik (KO-NDM)	320 ± 33.8	16
G-protein Gα11 yoksun + Diyabetik (KO-DM)	269.5 ± 15.2 **	16

*, $p<0.05$ WT-NDM ile WT-DM karşılaştırıldığında

**, $p<0.05$ KO-NDM ile KO-DM karşılaştırıldığında



Şekil 4. 3. Miyokardiyal kas liflerinde VEGFR2'nin total formunun lokalizasyonu ve boyanma yoğunluğunun dansitometrik analizi.

A: WT-NDM, B: WT-DM, C: KO-NDM, D: KO-DM. a; WT-NDM grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel farklılığı göstermektedir, b; WT-DM grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel farklılığı göstermektedir, c; KO-NDM grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel farklılığı göstermektedir. Bar: 50 μ m.

4. 7. Kalp Kası Liflerinde p-VEGFR2'nin Ekspresyonu

VEGFR2'nin fosforile formunun ekspresyonu ile ilgili bulguların, VEGFR2'nin total formunun ekspresyonu ile ilgili bulgularla, aynı çizgide olduğu tespit edildi. Koroner damarlardaki en yüksek fosforile VEGFR2 ekspresyonu WT-NDM grubunda (686.6 ± 35.3 dansitometrik ünite), daha düşük fosforile VEGFR2 ekspresyonunun ise WT-DM grubunda (369.3 ± 32.3 dansitometrik ünite) olduğu tespit edildi (Şekil 4.4, Tablo 4.6).

KO-NDM (280.7 ± 35.3 dansitometrik ünite) ve KO-DM (233.7 ± 27.6

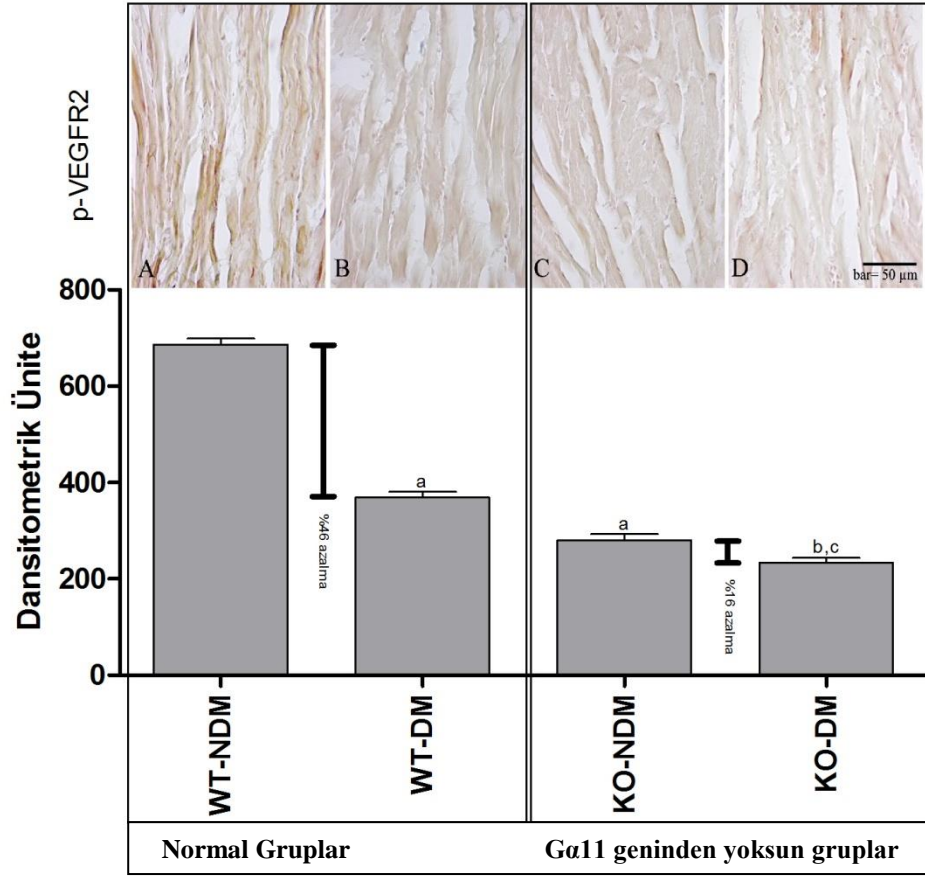
dansitometrik ünite) gruplarında, WT-NDM (686.6 ± 35.3 dansitometrik ünite) ve WT-DM (369.3 ± 32.3 dansitometrik ünite) gruplarına göre, daha zayıf bir boyanma yoğunluğu tespit edildi. Diyabet ile birlikte normal farelerde, p-VEGFR2 ekspresyonunda %46'lık bir azalma gözlenirken, Gα11'den yoksun farelerde ise %16'lık bir azalma gözlemlendi. En düşük p-VEGFR2 ekspresyonu, Gα11'den yoksun diyabetik deneklerde (KO-DM; 233.7 ± 27.6 dansitometrik ünite) tespit edildi (Şekil 4.4, 4.6).

Tablo 4. 6. Miyokardiyal kas liflerinde p-VEGFR2'nin ekspresyonu

GRUP	p-VEGFR2 ekspresyonu (Dansitometrik ünite)	Denek sayısı
Normal-tip + Nondiyabetik (WT-NDM)	686.6 ± 35.3	16
Normal-tip + Diyabetik (WT-DM)	$369.3 \pm 32.3^*$	16
G-protein Gα11 yoksun + Nondiyabetik (KO-NDM)	280.7 ± 35.3	16
G-protein Gα11 yoksun + Diyabetik (KO-DM)	$233.7 \pm 27.6^{**}$	16

*, $p < 0.05$ WT-NDM ile WT-DM karşılaştırıldığında

** , $p < 0.05$ KO-NDM ile KO-DM karşılaştırıldığında



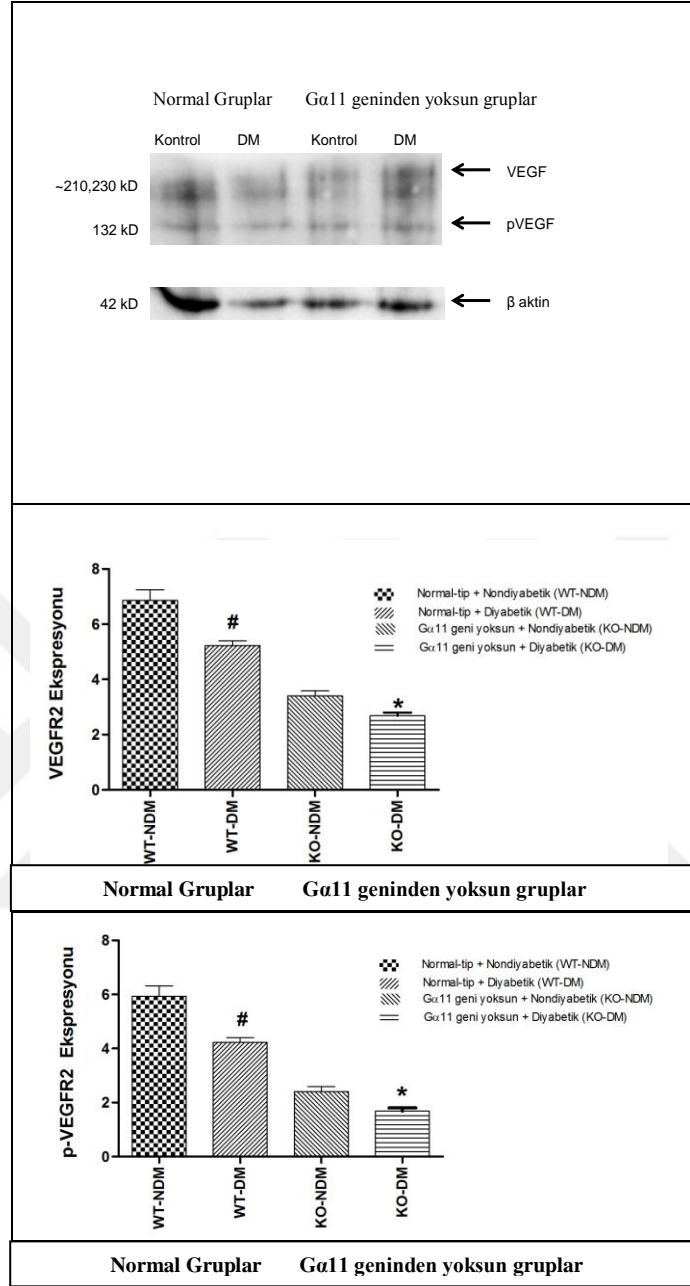
Şekil 4. 4. Miyokardiyal kas liflerinde VEGFR2'nin fosforile formunun lokalizasyonu ve boyanma yoğunluğunun densitometrik analizi.

A: WT-NDM, B: WT-DM, C: KO-NDM, D: KO-DM. a; WT-NDM grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel farklılığı göstermektedir, b; WT-DM grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel farklılığı göstermektedir, c; KO-NDM grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel farklılığı göstermektedir. Bar: 50 µm.

4. 8. Western Blot Analizi Bulguları

Deney gruplarından alınan kalp dokularından T-PER (Tissue Protein Extraction Reagent) ile protein izolasyonu yapıldı. Ardından tüm deney gruplarındaki ve total ve fosforile VEGFR2 proteinlerinin yoğunlukları western blot yöntemi ile belirlendi. Sonuçları kontrol etmek amacıyla, β -aktin antikoru ile eşit miktarda protein kullanıp kullanılmadığı teyit edildi. Gruplardaki proteinlerin western blot bantları, ImageJ (NIH) programı ile kantite edilerek değerler istatistiksel olarak değerlendirildi.

Total ve fosforile VEGFR2 proteinlerinin, hem normal tip, hem de G α 11 geninden yoksun diyabetiklerdeki ve de kontrol gruplarındaki ekspresyonları Şekil 4.5’de izlenmektedir. Deney gruplarından alınan kalp dokularından izole edilen proteinlerdeki total ve fosforile VEGFR2 western blot bantlarının, hem normal tip, hem de G α 11 geninden yoksun diyabetiklerde, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) miktarda, daha az yoğun olduğu belirlendi.



Şekil 4. 5. Miyokardiyal kas liflerinde VEGFR2'nin total ve fosforile formlarının western blot bantları izlenmektedir.

#; WT-NDM grubu ile WT-DM grubu karşılaştırıldığında istatistiksel farklılığı göstermektedir, *; KO-NDM grubu ile KO-DM grubu karşılaştırıldığında istatistiksel farklılığı göstermektedir.

TARTIŞMA

Diyabetik hastalarda aterosklerozun çabuk gelişen formu sıklıkla görülür [83]. Koroner arter hastalığının tedavisinde, pekçok gelişmenin olmasına rağmen rekürrent koroner kalp hastalığı oranı hala yüksek seviyededir ve mortalite oranı diyabetli kişilerde daha yüksektir [83-85]. Diyabetik aterosklerozun nedenlerinden biri, hiperglisemik ortamın vasküler düz kas proliferasyonunu ve normoglisemiden dolayı daha hızlı bir şekilde migrasyonu indüklemesidir [83, 85, 86].

Koroner damardaki kollateral damar formasyonu, damarın obstrüksiyonu sırasında miyokardiyal fonksiyonun korunmasına yardım eden bir faktördür. Koroner kollateral damarların varlığı, koroner damarların akut oklüzyonu sonrası fonksiyonel defisitini miyokardiyal iskemi derecesini azaltır [87, 88]. Pekçok çalışmada bu önemli mekanizmada VEGF'in rol aldığı bildirilmiştir [88, 89].

Varolan bir damardan, yeni damarların oluşması anjiogenez olarak bilinir. Anjiogenez, fizyolojik (örneğin embriyolojik gelişim ve yara iyileşmesindeki anjiogenez) ve patolojik (tümör gelişimi ve metastazdaki anjiogenez) durumlar açısından anahtar bir rol oynar [36]. VEGF'in postnatal anjiogenez ve kanser, inflamasyon, kalp yetmezliği [90], kardiyak hipertrofi [36, 91], periferik arter hastalığı [92], iskemik kalp hastalığı [93] ve vasküler yetmezlikler [88, 94, 95] gibi patofizyolojik süreçlerde rol aldığına dair kanıtlar literatürde rapor edilmiştir.

Anjiyogenez, endotelial hücre proliferasyon, migrasyon, morfolojik diferansiyasyon gibi çeşitli hücresel süreçler tarafından regüle edilir ve intraselüler sinyal yolları ile yakından ilişkilidir [96]. VEGF anjiogenezi indükler ve endotelial proliferasyonu, permeabiliteyi, sağkalımı modüle eder [97] ve arter, ven, lenf damarlarındaki endotel hücrelerine spesifik bir mitojendir [98].

VEGF endotel hücresi için sadece direk bir mitojen olmayıp aynı zamanda *in vivo* düzeyde kapiller oluşumunu stimüle eden potent bir anjiogenik role sahiptir [98].

VEGF'in kardiyovasküler sistem üzerindeki etkilerini hangi mekanizmalar üzerinden gerçekleştirdiği bu anlamda önem kazanmaktadır [99]. VEGF bir multifonksiyonel sitokindir ve *in vitro* olarak endotel hücrelerinde ve *in vivo* olarak erişkin damarlarında çeşitli biyolojik etkileri vardır. Bu biyolojik etkilerini protein tirozin kinaz reseptörleri (VEGFR1 ve VEGFR2) yardımıyla gerçekleştirir [100]. Bu reseptörler tirozin kinaz aktivitesine sahiptir ve özellikle endotel hücrelerinde eksprese olurlar [38-40] ve fizyolojik-patolojik süreçleri regüle ederler [92]. VEGF'in spesifik reseptörüne bağlanması, intraselüler kinaz domainin otofosforilasyonuna yol açarak, lenfoendotelial veya endotel aktivitesinde kemotaktik ve mitojenik etkilerin görülmesini sağlar [101]. VEGFR2 çoğunlukla endotel hücrelerinin yüzeyinde lokalize olmuştur ve VEGFR2'nin endotel hücre proliferasyonunu, migrasyonunu ve *in vivo* anjiogenezi başlattığı bilinir [100].

Diyabetin, kardiyovasküler komplikasyon riskini 2-4 kat arttırdığı ve diyabetle ilişkili ölümlerin $\frac{3}{4}$ 'ünü oluşturduğu rapor edilmiştir [83, 102]. Tip 1 ve Tip 2 diyabet, azalmış ventriküler diastolik gevşeme, azalmış dolma zamanı, ventriküler hipertrofi ile karakterize olan kardiyomiyopatiye sebep olur [103-105].

Diyabetik kardiyomiyopati ve koroner arter hastalığı çeşitli deney hayvanı modellerinde çalışılmıştır [81, 82]. Diyabetik kardiyomiyopatinin çalışılması için, uygun bir model, miyozin ağır zinciri (MHC)-peroksizom proliferatör aktivasyonlu, reseptör- α (PPAR α)'nın transkripsiyon faktörünün aşırı ekspresyonu olan fare modelidir. MHC-PPAR transgenik fareler, diğer dokular yerine kalbin diyabetik durumu ile aynı fenotipe sahiptirler. Bu farelerde, sistolik ventriküler disfonksiyonunda, transgen ekspresyonu bağımlı değişiklikler, patolojik hipertrofik gelişimin gen markerlerinin aktivasyonu ve ventriküler hipertrofiye sahip kardiyomiyopati gelişir [106]. Bir diğer deney hayvanı modeli

ise bu çalışmada uygulandığı gibi streptozotosinin sistemik verilmesidir [107].

Kardiyak enfarktüs modelinde, VEGF, VEGFR1, ve VEGFR2 mRNA ekspresyonunun sırasıyla %275, %40 ve %375 oranında arttığı bildirilmiştir [108]. Domuzlarda, kardiopulmoner bypass sonrasında miyokardiyal VEGF ve VEGFR2 ekspresyonunun sırasıyla 4 ve 6 kat arttığı rapor edilmiştir [109]. İzole kalplerin bulunduğu solüsyona VEGF eklenmesi sonucu kardiyak fonksiyonda, koroner kan akımında, belirgin bir iyileşme olduğu da rapor edilmiştir [110]. Bu çalışmamızda da streptozotosin ile indüklenen hipertrofik diyabetik deneklerin kalplerinde, VEGFR2'in ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) bir azalma olduğu tespit edildi. WT-NDM grubunda, VEGFR2'nin ekspresyonunun (WT-NDM; 722 ± 31.8 dansitometrik ünite) WT-DM grubuna (WT-DM; 436.1 ± 35.1 dansitometrik ünite) göre istatistiksel olarak anlamlı bir artışla ($p < 0.05$) daha yoğun bir boyanma oluşturduğu tespit edildi. Ayrıca KO-NDM grubunda, VEGFR2 ekspresyonunda (KO-NDM; 317.2 ± 36.8 dansitometrik ünite), KO-DM grubuna (KO-DM; 264.5 ± 35.8 dansitometrik ünite) göre istatistiksel olarak daha yüksek ($p < 0.05$) bir boyanma yoğunluğu tespit edildi. Yani diyabet ile birlikte normal farelerde VEGFR2 ekspresyonunda %39'luk bir azalma gözlenirken, Ga11 geninden yoksun farelerde ise %16'lık bir azalma gözlemlendi.

Streptozotosin ile indüklenen diyabette kardiyomiyopati gelişir. Bu kardiyomiyopati, azalmış ventriküler komplians ile karakterize abnormal diastolik fonksiyon, azalmış sol ventrikül kontraktilesi, azalmış inotropik ve kronotropik cevaplar ile karakterizedir [107, 111, 112]. Bizim çalışmamızda da diyabetin etkisiyle WT-DM ve KO-DM gruplarının diastolik ve sistolik değerlerinde, istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu ($p < 0.05$) tespit edildi.

Diyabetik kardiyomiyopati, iskemik kardiyomiyopatiden ayrı bir durumdur. Diyabetik kardiyomiyopatide koroner arter hastalığı mevcut değildir [104, 113]. Hücre metabolizmasındaki değişikliklerde, özellikle G protein ailesinin Gq sınıfının rolünün olduğu ve bu bu yolağın diyabetik kalp hastalığındaki miyokardiyal hipertrofide rol aldığı ve G proteine bağlı

mediatörlerin, diyabetik ortamda, kalpte ekspresyonlarının değiştiği bildirilmiştir [114, 115]. Örneğin; Gαq proteinin ve protein kinaz C aktivitesinin, streptozotosin ile indüklenen diyabet sonrası rat myokardiumunda arttığı tespit edilmiştir [116-119]. Ayrıca, diaçilgliserol seviyesi de diyabetik kalplerde artış gösterir ve bu durum artmış fosfolipaz C aktivitesini yansıtmaktadır. Miyokardiyal protein kinaz C aktivasyonunun, anjiotensin 1 reseptör antagonisti ile diyabetik ratların tedavi edilmesinde de kullanılabildiği rapor edilmiştir [117]. Bu çalışmada da VEGFR2 ekspresyonunda , WT-DM (436.1 ± 35.1 dansitometrik ünite) ve KO-DM (264.5 ± 35.8 dansitometrik ünite) grupları arasında, bununla birlikte KO-NDM (317.2 ± 36.8 dansitometrik ünite) grubu ile WT-NDM (722 ± 31.8 dansitometrik ünite) grupları arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark ($p < 0.05$) tespit edildi. Yani hem diyabetik, hem de diyabetik olmayan Gα11 geninden yoksun gruplarda daha zayıf bir boyanma yoğunluğu ortaya çıktı. En düşük VEGFR2 ekspresyonu, Gα11'den yoksun diyabetik deneklerde gözlemlendi. Bu sonuçlar doğrultusunda şunu diyebiliriz ki; Gα11 geni, VEGFR2 ekspresyonunda direkt ya da dolaylı aktif bir role sahiptir, ve bu genin yokluğunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma ($p < 0.05$) olduğu gibi, diyabetik ortamda da, VEGFR2'nin ekspresyonunu baskılanmıştır ve iki etken bir araya gelince KO-DM grubunda gözlemlendiği gibi, en az boyanma ortaya çıkmıştır. Bu konuda daha önceden yapılmış bir çalışma yoktur ve bu sonuç literatürdeki çalışmalara ışık tutup, zemin oluşturması bakımından oldukça anlamlıdır.

VEGFR2'nin fosforile formunun ekspresyonu ile ilgili bulgularımızın VEGFR2'nin total formunun ekspresyonu ile ilgili bulgularımız ile aynı çizgide olduğu tespit edildi.

Bütün bu bulgular değerlendirildiğinde, diyabetin VEGFR2 miyokardiyal liflerde ve koroner damarlarda eksprese olduğunu göstermektedir. Ayrıca, Gα11'den yoksun diyabetik deneklerde görülen total ve fosforile VEGFR2 ekspresyonunun düşmesinin de, Gα11'in ve diyabetin bu ekspresyonda etkili olduğunu göstermektedir.

SONUÇLAR

Patolojik kardiyak hipertrofi ve diastolik disfonksiyon her iki diyabet tipinde ortak bir özelliktir. Diyabetteki hipertrofik cevapta, aşırı nörohormonal uyarılma sonucu, $G\alpha 11$ 'in etkin olduğu ortaya çıkarmaktadır. Ayrıca VEGFR2'nin, protein kinaz aktivasyonunu içeren sinyal yollarının aktivasyonu yolu ile, kardiyomyopatinin ve fizyolojik-patolojik anjiogenezin başlatılması söz konusudur.

Bu çalışmada, VEGFR2'nin ekspresyonunun anlamlı seviyede düştüğü tespit edildi. $G\alpha 11$ 'den yoksun farelerde VEGFR2'nin total ve fosforile formlarının normal farelere oranla, daha güçlü bir şekilde düşüş gösterdiği gözlemlendi. Bu durum, VEGF'in koroner damarlarda ve miyokardiyal liflerde reseptör aracılı olarak regüle edildiği ve bu regülasyonda $G\alpha 11$ ile ilişkili sinyal yollarının rol aldığı tespit edildi. Sonuç olarak, $G\alpha 11$ 'in, VEGFR2'nin koroner damarlarda ve miyokardiyal liflerdeki aktivitesine etki ettiği kanaatindeyiz.

Bu bulgular birlikte değerlendirildiğinde, $G\alpha 11$ ile ilişkili sinyal yollarının, diyabetik ortamda gözlenen ventriküler hipertrofide ve VEGFR2'nin total ve fosforile formlarının ekspresyonunda, merkezi bir rol üstlendiğini göstermektedir. Bu çalışma sonucu elde edilen bulgular doğrultusunda, $G\alpha 11$ ile ilişkili sinyal yollarının ve de VEGF reseptörü(leri)'nün diyabet ile ilişkili kardiyak hastalıklar açısından daha detaylı araştırılması gerektiği kanaatindeyiz.

ÖZGEÇMİŞ

Yasemin Behram Kandemir 16. 08. 1979 tarihinde Şanlıurfa'da doğdu. İlköğrenimini Vatan İlkokulu'nda, ortaöğrenimi Orhangazi Ortaokulu'nda tamamladı. 1997 yılında Şanlıurfa Lisesi'nden mezun oldu. Lisans öğrenimini 2002 yılında Akdeniz Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde tamamladı. Aynı yıl Harran Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nde Biyokimya Yüksek Lisans Programına başladı ve bu programı 2004 yılında tamamladı. 2009 yılında Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nde Anatomi Yüksek Lisans eğitimine başladı. 2010 yılında, aynı bölümde araştırma görevlisi kadrosuna atandı. 2012 yılında, Prof. Dr. Yaşar Uçar Klinik Anatomi Ünitesi'nde, biyolog olarak görevlendirildi. Halen Anatomi Anabilimdalı'nda doktora eğitimine devam edip, aynı üniteye görev yapmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Dellal F Diyabetik hastalarda sessiz miyokardiyal iskemi sıklığının saptanmasında egzersiz elektrokardiyal ve talyumlu mykard perfüzyon intigrafisinin karşılaştırılması. . İstanbul, Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi., 2006.
2. Kafadenk G Yeni tanı konmuş tip 2 diyabet hastalarıyla kontrollü ve kontrolsüz diyabet hastalarının homosistein ve HbA1c düzeylerinin diyabetik kronik komplikasyonlarıyla ilişkisi.: Biyokimya ve Klinik Biyokimya Bölümü. İstanbul, T.C. Sağlık Bakanlığı Şişli Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi 2006.
3. Satman İ <http://www.diabetcemiyeti.org/>. 2015.
4. Kim HK, Bae SJ, Choe J (2012) Impact of HbA1c Criterion on the Detection of Subjects with Increased Risk for Diabetes among Health Check-Up Recipients in Korea. *Diabetes Metab J.* 36:151-6.
5. Pan XR, Li GW, Hu YH, et al. (1997) Effects of diet and exercise in preventing NIDDM in people with impaired glucose tolerance. The Da Qing IGT and Diabetes Study. *Diabetes care.* 20:537-44.
6. Reasner CA, Defronzo RA (2001) Treatment of type 2 diabetes mellitus: a rational approach based on its pathophysiology. *American family physician.* 63:1687-8, 91-2, 94.
7. Gispen WH, Biessels GJ (2000) Cognition and synaptic plasticity in diabetes mellitus. *Trends Neurosci.* 23:542-9.
8. Rother KI (2007) Diabetes treatment--bridging the divide. *N Engl J Med.* 356:1499-501.
9. Karasu C, Ozturk Y, Altan N, Yildizoglu-Ari N, Ikizler C, Altan VM (1990) Thyroid hormones mediated effect of insulin on alloxan diabetic rat atria. *Gen Pharmacol.* 21:735-40.
10. Yu Z, McNeill JH (1991) Altered inotropic responses in diabetic cardiomyopathy and hypertensive-diabetic cardiomyopathy. *J Pharmacol Exp Ther.* 257:64-71.
11. Gando S, Hattori Y, Akaishi Y, Nishihira J, Kanno M (1997) Impaired contractile response to beta adrenoceptor stimulation in diabetic rat hearts: alterations in beta adrenoceptors-G protein-adenylate cyclase system and phospholamban phosphorylation. *J Pharmacol Exp Ther.* 282:475-84.

12. Yamamoto J, Nakai M (1990) Coronary hemodynamics in diabetic spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Hypertens A*. 12:325-42.
13. Tomlinson KC, Gardiner SM, Hebden RA, Bennett T (1992) Functional consequences of streptozotocin-induced diabetes mellitus, with particular reference to the cardiovascular system. *Pharmacol Rev*. 44:103-50.
14. Rodrigues B, Ross JR, Farahbakshian S, McNeill JH (1990) Effects of in vivo and in vitro treatment with L-carnitine on isolated hearts from chronically diabetic rats. *Can J Physiol Pharmacol*. 68:1085-92.
15. Sundaresan PR, Sharma VK, Gingold SI, Banerjee SP (1984) Decreased beta-adrenergic receptors in rat heart in streptozotocin-induced diabetes: role of thyroid hormones. *Endocrinology*. 114:1358-63.
16. Savarese JJ, Berkowitz BA (1979) beta-Adrenergic receptor decrease in diabetic rat hearts. *Life Sci*. 25:2075-8.
17. Donnelly R (1992) Angiotensin-converting enzyme inhibitors and insulin sensitivity: metabolic effects in hypertension, diabetes, and heart failure. *J Cardiovasc Pharmacol*. 20 Suppl 11:S38-44.
18. Reaven GM, Laws A (1994) Insulin resistance, compensatory hyperinsulinaemia, and coronary heart disease. *Diabetologia*. 37:948-52.
19. Chatham JC, Forder JR (1996) Metabolic compartmentation of lactate in the glucose-perfused rat heart. *Am J Physiol*. 270:H224-9.
20. Rodrigues B, McNeill JH (1992) The diabetic heart: metabolic causes for the development of a cardiomyopathy. *Cardiovasc Res*. 26:913-22.
21. Taegtmeyer H, McNulty P, Young ME (2002) Adaptation and maladaptation of the heart in diabetes: Part I: general concepts. *Circulation*. 105:1727-33.
22. Otterstad JE, Smiseth O, Kjeldsen SE (1996) Hypertensive left ventricular hypertrophy: pathophysiology, assessment and treatment. *Blood Press*. 5:5-15.
23. Litovsky SH, Farb A, Burke AP, et al. (1996) Effect of age, race, body surface area, heart weight and atherosclerosis on coronary artery dimensions in young males. *Atherosclerosis*. 123:243-50.

24. Christenson JT, Simonet F, Schmuziger M (1996) The impact of a short interval (< or = 1 year) between primary and reoperative coronary artery bypass grafting procedures. *Cardiovasc Surg.* 4:801-7.
25. Riegger GA (1996) Role of the renin-angiotensin system as a risk factor for control of morbidity and mortality in coronary artery disease. *Cardiovasc Drugs Ther.* 10 Suppl 2:613-5.
26. Bouchard A, Sanz N, Botvinick EH, et al. (1989) Noninvasive assessment of cardiomyopathy in normotensive diabetic patients between 20 and 50 years old. *Am J Med.* 87:160-6.
27. Factor SM, Borczuk A, Charron MJ, Fein FS, van Hoeven KH, Sonnenblick EH (1996) Myocardial alterations in diabetes and hypertension. *Diabetes Res Clin Pract.* 31 Suppl:S133-42.
28. Galderisi M, Anderson KM, Wilson PW, Levy D (1991) Echocardiographic evidence for the existence of a distinct diabetic cardiomyopathy (the Framingham Heart Study). *Am J Cardiol.* 68:85-9.
29. Kahn JK, Zola B, Juni JE, Vinik AI (1986) Radionuclide assessment of left ventricular diastolic filling in diabetes mellitus with and without cardiac autonomic neuropathy. *J Am Coll Cardiol.* 7:1303-9.
30. Kimball TR, Daniels SR, Khoury PR, Magnotti RA, Turner AM, Dolan LM (1994) Cardiovascular status in young patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Circulation.* 90:357-61.
31. Rosen P, Ballhausen T, Stockklauser K (1996) Impairment of endothelium dependent relaxation in the diabetic rat heart: mechanisms and implications. *Diabetes Res Clin Pract.* 31 Suppl:S143-55.
32. Regan TJ, Wu CF, Yeh CK, Oldewurtel HA, Haider B (1981) Myocardial composition and function in diabetes. The effects of chronic insulin use. *Circulation research.* 49:1268-77.
33. Stiver SI, Tan X, Brown LF, Hedley-Whyte ET, Dvorak HF (2004) VEGF-A angiogenesis induces a stable neovasculature in adult murine brain. *J Neuropathol Exp Neurol.* 63:841-55.
34. LeCouter J, Lin R, Ferrara N (2002) The role of EG-VEGF in the regulation of angiogenesis in endocrine glands. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 67:217-21.

35. Carmeliet P, Moons L, Luttun A, et al. (2001) Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat Med.* 7:575-83.
36. Folkman J (1971) Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med.* 285:1182-6.
37. Lucerna M, Zerneck A, de Nooijer R, et al. (2007) Vascular endothelial growth factor-A induces plaque expansion in ApoE knock-out mice by promoting de novo leukocyte recruitment. *Blood.* 109:122-9.
38. Cross MJ, Dixelius J, Matsumoto T, Claesson-Welsh L (2003) VEGF-receptor signal transduction. *Trends Biochem Sci.* 28:488-94.
39. Matsumoto T, Claesson-Welsh L (2001) VEGF receptor signal transduction. *Sci STKE.* 2001:re21.
40. Matsumoto T, Mugishima H (2006) Signal transduction via vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors and their roles in atherogenesis. *J Atheroscler Thromb.* 13:130-5.
41. Gerber HP, Ferrara N (2003) The role of VEGF in normal and neoplastic hematopoiesis. *J Mol Med (Berl).* 81:20-31.
42. Jesmin S, Mowa CN, Sultana SN, et al. (2010) VEGF signaling is disrupted in the hearts of mice lacking estrogen receptor alpha. *Eur J Pharmacol.* 641:168-78.
43. Yoon YS, Johnson IA, Park JS, Diaz L, Losordo DW (2004) Therapeutic myocardial angiogenesis with vascular endothelial growth factors. *Molecular and cellular biochemistry.* 264:63-74.
44. Berse B, Brown LF, Van de Water L, Dvorak HF, Senger DR (1992) Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) gene is expressed differentially in normal tissues, macrophages, and tumors. *Mol Biol Cell.* 3:211-20.
45. Ellis LM, Fidler IJ (1996) Angiogenesis and metastasis. *Eur J Cancer.* 32A:2451-60.
46. Veikkola T, Karkkainen M, Claesson-Welsh L, Alitalo K (2000) Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors. *Cancer Res.* 60:203-12.

47. Jeltsch M, Kaipainen A, Joukov V, et al. (1997) Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice. *Science*. 276:1423-5.
48. Otrrock ZK, Makarem JA, Shamseddine AI (2007) Vascular endothelial growth factor family of ligands and receptors: review. *Blood Cells Mol Dis*. 38:258-68.
49. Joukov V, Pajusola K, Kaipainen A, et al. (1996) A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *EMBO J*. 15:290-98.
50. Achen MG, Jeltsch M, Kukk E, et al. (1998) Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk1) and VEGF receptor 3 (Flt4). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 95:548-53.
51. Joukov V, Sorsa T, Kumar V, et al. (1997) Proteolytic processing regulates receptor specificity and activity of VEGF-C. *EMBO J*. 16:3898-911.
52. Kaipainen A, Korhonen J, Mustonen T, et al. (1995) Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 92:3566-70.
53. Swartz MA, Skobe M (2001) Lymphatic function, lymphangiogenesis, and cancer metastasis. *Microsc Res Tech*. 55:92-9.
54. Dumont DJ, Jussila L, Taipale J, et al. (1998) Cardiovascular failure in mouse embryos deficient in VEGF receptor-3. *Science*. 282:946-9.
55. Lee J, Gray A, Yuan J, Luoh SM, Avraham H, Wood WI (1996) Vascular endothelial growth factor-related protein: a ligand and specific activator of the tyrosine kinase receptor Flt4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 93:1988-92.
56. Marconcini L, Marchio S, Morbidelli L, et al. (1999) c-fos-induced growth factor/vascular endothelial growth factor D induces angiogenesis in vivo and in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 96:9671-6.

57. Makinen T, Jussila L, Veikkola T, et al. (2001) Inhibition of lymphangiogenesis with resulting lymphedema in transgenic mice expressing soluble VEGF receptor-3. *Nat Med.* 7:199-205.
58. Karkkainen MJ, Petrova TV (2000) Vascular endothelial growth factor receptors in the regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Oncogene.* 19:5598-605.
59. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM (1995) Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol.* 146:1029-39.
60. Vincenti V, Cassano C, Rocchi M, Persico G (1996) Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3. *Circulation.* 93:1493-5.
61. Liu Y, Cox SR, Morita T, Kourembanas S (1995) Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells. Identification of a 5' enhancer. *Circulation research.* 77:638-43.
62. Kim BS, Goligorsky MS (2003) Role of VEGF in kidney development, microvascular maintenance and pathophysiology of renal disease. *The Korean journal of internal medicine.* 18:65-75.
63. Huang LE, Arany Z, Livingston DM, Bunn HF (1996) Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit. *The Journal of biological chemistry.* 271:32253-9.
64. Osawa S, Dhanasekaran N, Woon CW, Johnson GL (1990) G alpha i-G alpha s chimeras define the function of alpha chain domains in control of G protein activation and beta gamma subunit complex interactions. *Cell.* 63:697-706.
65. Raymond JR (1994) Hereditary and acquired defects in signaling through the hormone-receptor-G protein complex. *Am J Physiol.* 266:F163-74.
66. Hepler JR, Gilman AG (1992) G proteins. *Trends Biochem Sci.* 17:383-7.
67. Lupas AN, Lupas JM, Stock JB (1992) Do G protein subunits associate via a three-stranded coiled coil? *FEBS letters.* 314:105-8.
68. Dratz EA, Furstenau JE, Lambert CG, et al. (1993) NMR structure of a receptor-bound G-protein peptide. *Nature.* 363:276-81.

69. Federman AD, Conklin BR, Schrader KA, Reed RR, Bourne HR (1992) Hormonal stimulation of adenylyl cyclase through Gi-protein beta gamma subunits. *Nature*. 356:159-61.
70. Rondard P, Iiri T, Srinivasan S, Meng E, Fujita T, Bourne HR (2001) Mutant G protein alpha subunit activated by Gbeta gamma: a model for receptor activation? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 98:6150-5.
71. Sensoren/ hws-bawwdwuuhwimrab Wie wir die Welt um uns herum wahrnehmen – Membran-Rezeptoren als biologische Sensoren. *Science-Blog*, 2012.
72. Landis CA, Masters SB, Spada A, Pace AM, Bourne HR, Vallar L (1989) GTPase inhibiting mutations activate the alpha chain of Gs and stimulate adenylyl cyclase in human pituitary tumours. *Nature*. 340:692-6.
73. Vallar L (1996) Oncogenic role of heterotrimeric G proteins. *Cancer Surv*. 27:325-38.
74. Lyons J, Landis CA, Harsh G, et al. (1990) Two G protein oncogenes in human endocrine tumors. *Science*. 249:655-9.
75. Simon MI, Strathmann MP, Gautam N (1991) Diversity of G proteins in signal transduction. *Science*. 252:802-8.
76. Noel JP, Hamm HE, Sigler PB (1993) The 2.2 Å crystal structure of transducin-alpha complexed with GTP gamma S. *Nature*. 366:654-63.
77. Iiri T, Ohoka Y, Ui M, Katada T (1991) Functional modification by cholera-toxin-catalyzed ADP-ribosylation of a guanine-nucleotide-binding regulatory protein serving as the substrate of pertussis toxin. *Eur J Biochem*. 202:635-41.
78. Berlot CH, Bourne HR (1992) Identification of effector-activating residues of Gs alpha. *Cell*. 68:911-22.
79. Gautam N, Baetscher M, Aebersold R, Simon MI (1989) A G protein gamma subunit shares homology with ras proteins. *Science*. 244:971-4.
80. Zhao TJ, Liang G, Li RL, et al. (2010) Ghrelin O-acyltransferase (GOAT) is essential for growth hormone-mediated survival of calorie-restricted mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107:7467-72.

81. Hoyer DP, Korkmaz Y, Gronke S, et al. (2010) Differential expression of protein kinase C isoforms in coronary arteries of diabetic mice lacking the G-protein Galpha11. *Cardiovascular diabetology*. 9:93.
82. Reuter H, Seuthe K, Korkmaz Y, et al. (2013) The G protein Galpha11 is essential for hypertrophic signalling in diabetic myocardium. *International journal of cardiology*. 167:1476-85.
83. Aronson D, Edelman ER (2010) Revascularization for coronary artery disease in diabetes mellitus: angioplasty, stents and coronary artery bypass grafting. *Rev Endocr Metab Disord*. 11:75-86.
84. Briffa TG, Hobbs MS, Tonkin A, et al. (2011) Population trends of recurrent coronary heart disease event rates remain high. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes*. 4:107-13.
85. Haffner SM, Lehto S, Ronnema T, Pyorala K, Laakso M (1998) Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *N Engl J Med*. 339:229-34.
86. Aronson D, Rayfield EJ, Chesebro JH (1997) Mechanisms determining course and outcome of diabetic patients who have had acute myocardial infarction. *Ann Intern Med*. 126:296-306.
87. Haffner SM, Stern MP, Hazuda HP, Mitchell BD, Patterson JK (1990) Cardiovascular risk factors in confirmed prediabetic individuals. Does the clock for coronary heart disease start ticking before the onset of clinical diabetes? *JAMA*. 263:2893-8.
88. Banai S, Jaklitsch MT, Shou M, et al. (1994) Angiogenic-induced enhancement of collateral blood flow to ischemic myocardium by vascular endothelial growth factor in dogs. *Circulation*. 89:2183-9.
89. Ladoux A, Frelin C (1993) Hypoxia is a strong inducer of vascular endothelial growth factor mRNA expression in the heart. *Biochemical and biophysical research communications*. 195:1005-10.
90. Isner JM, Losordo DW (1999) Therapeutic angiogenesis for heart failure. *Nat Med*. 5:491-2.
91. Ferrara N (2002) Role of vascular endothelial growth factor in physiologic and pathologic angiogenesis: therapeutic implications. *Semin Oncol*. 29:10-4.
92. Folkman J (1995) Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med*. 1:27-31.

93. D'Amore PA, Ng YS (2002) Won't you be my neighbor? Local induction of arteriogenesis. *Cell*. 110:289-92.
94. Friedman RS, Mufson MJ, Eisenberg TD, Patel MR (2003) Medically and psychiatrically ill: the challenge of delirious mania. *Harv Rev Psychiatry*. 11:91-8.
95. Pepper MS (1997) Manipulating angiogenesis. From basic science to the bedside. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 17:605-19.
96. Bussolino F, Mantovani A, Persico G (1997) Molecular mechanisms of blood vessel formation. *Trends Biochem Sci*. 22:251-6.
97. Bates DO, Curry FE (1996) Vascular endothelial growth factor increases hydraulic conductivity of isolated perfused microvessels. *Am J Physiol*. 271:H2520-8.
98. Pandya NM, Dhalla NS, Santani DD (2006) Angiogenesis--a new target for future therapy. *Vascul Pharmacol*. 44:265-74.
99. Zachary I, Mathur A, Yla-Herttuala S, Martin J (2000) Vascular protection: A novel nonangiogenic cardiovascular role for vascular endothelial growth factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 20:1512-20.
100. Dai J, Rabie AB (2007) VEGF: an essential mediator of both angiogenesis and endochondral ossification. *J Dent Res*. 86:937-50.
101. Rahimi N (2006) Vascular endothelial growth factor receptors: molecular mechanisms of activation and therapeutic potentials. *Exp Eye Res*. 83:1005-16.
102. Boudina S, Abel ED (2007) Diabetic cardiomyopathy revisited. *Circulation*. 115:3213-23.
103. Devereux RB, Roman MJ, Paranicas M, et al. (2000) Impact of diabetes on cardiac structure and function: the strong heart study. *Circulation*. 101:2271-6.
104. Dhalla NS, Pierce GN, Innes IR, Beamish RE (1985) Pathogenesis of cardiac dysfunction in diabetes mellitus. *Can J Cardiol*. 1:263-81.
105. Regan TJ, Ahmed S, Haider B, Moschos C, Weisse A (1994) Diabetic cardiomyopathy: experimental and clinical observations. *N J Med*. 91:776-8.

106. Finck BN, Lehman JJ, Leone TC, et al. (2002) The cardiac phenotype induced by PPAR α overexpression mimics that caused by diabetes mellitus. *J Clin Invest.* 109:121-30.
107. Fischer LJ, Rickert DE (1975) Pancreatic islet-cell toxicity. *CRC Crit Rev Toxicol.* 3:231-63.
108. Li J, Brown LF, Hibberd MG, Grossman JD, Morgan JP, Simons M (1996) VEGF, flk-1, andflt-1 expression in a rat myocardial infarction model of angiogenesis. *Am J Physiol.* 270:H1803-11.
109. Tofukuji M, Metais C, Li J, Franklin A, Simons M, Sellke FW (1998) Myocardial VEGF expression after cardiopulmonary bypass and cardioplegia. *Circulation.* 98:II242-6; discussion II7-8.
110. Luo Z, Diaco M, Murohara T, Ferrara N, Isner JM, Symes JF (1997) Vascular endothelial growth factor attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury. *Ann Thorac Surg.* 64:993-8.
111. Harris IS, Treskov I, Rowley MW, et al. (2004) G-protein signaling participates in the development of diabetic cardiomyopathy. *Diabetes.* 53:3082-90.
112. Joffe, II, Travers KE, Perreault-Micale CL, et al. (1999) Abnormal cardiac function in the streptozotocin-induced non-insulin-dependent diabetic rat: noninvasive assessment with doppler echocardiography and contribution of the nitric oxide pathway. *J Am Coll Cardiol.* 34:2111-9.
113. Tahiliani AG, McNeill JH (1986) Diabetes-induced abnormalities in the myocardium. *Life Sci.* 38:959-74.
114. Brownlee M (2001) Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature.* 414:813-20.
115. Cowan BR, Young AA, Anderson C, et al. (2009) Left ventricular mass and volume with telmisartan, ramipril, or combination in patients with previous atherosclerotic events or with diabetes mellitus (from the ONgoing Telmisartan Alone and in Combination With Ramipril Global Endpoint Trial [ONTARGET]). *Am J Cardiol.* 104:1484-9.
116. Koya D, King GL (1998) Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes.* 47:859-66.
117. Malhotra A, Reich D, Nakouzi A, Sanghi V, Geenen DL, Buttrick PM (1997) Experimental diabetes is associated with functional activation of protein kinase C epsilon and phosphorylation of

troponin I in the heart, which are prevented by angiotensin II receptor blockade. *Circ Res.* 81:1027-33.

- 118.** Xiang H, McNeill JH (1992) Protein kinase C activity is altered in diabetic rat hearts. *Biochem Biophys Res Commun.* 187:703-10.
- 119.** Yang JM, Cho CH, Kong KA, Jang IS, Kim HW, Juhn YS (1999) Increased expression of Galphaq protein in the heart of streptozotocin-induced diabetic rats. *Exp Mol Med.* 31:179-84.

